

## Résumé

En Nouvelle-Calédonie, les sols développés sur roches ultramafiques (5.500 km<sup>2</sup>) sont constitués à plus de 65% d'oxy-hydroxyde de fer, ils présentent des teneurs très faibles en azote et en phosphore (1/10 à 1/100 des teneurs moyennes), de surcroît ils sont déséquilibrés pour le rapport Ca/Mg et contiennent des concentrations très élevées en métaux lourds (nickel, manganèse, cobalt, chrome). L'exploitation à ciel ouvert du nickel sur ces sols associés à des écosystèmes particulièrement originaux et diversifiés doit prendre en considération à la fois les intérêts économiques et les préoccupations écologiques. Des espèces endémiques pionnières des sols ultramafiques ou cicatricielles des sites miniers dégradés ont été identifiées. Parmi ces espèces, plusieurs espèces de *Costularia* (Cyperaceae) sont préconisées pour la revégétalisation des sites miniers après exploitation. Les itinéraires techniques de restauration écologique des sites miniers requièrent une approche pluridisciplinaire intégrant des données pédologiques, physiologiques et microbiologiques des écosystèmes des maquis miniers.

L'analyse des relations sols/plantes sur une toposéquence comprenant différents types de maquis a permis de mettre en évidence une relation directe entre les concentrations du sol en éléments disponibles et la diversité et l'organisation des espèces, notamment pour ce qui concerne la structuration de la strate herbacée. Ce travail couplé à la mise en place par la société SIRAS Pacifique d'un champ semencier expérimental de Cyperaceae a permis de montrer que la croissance de *Costularia comosa* répond positivement à la fertilisation azotée et phosphatée. L'expérimentation a permis également de souligner que la vigueur, la vitesse de développement, le taux de mycorhization et la fructification des plants sont stimulés par des doses modérées de ces éléments.

D'autres travaux réalisés ont apporté un approfondissement de nos connaissances sur le rôle des microorganismes associés aux racines des *Costularia*. Ainsi, nous avons montré que neuf espèces pionnières de Cyperaceae étudiées *in situ*, développent des symbioses mycorhiziennes arbusculaires. Une expérience de mycorhization contrôlée de *Costularia comosa* a permis de montrer que la mycorhization par *Glomus etunicatum* est fonctionnelle, avec une augmentation de la biomasse des plants 2,8 fois supérieure au témoin. De plus, la mycorhization réduit la concentration en nickel dans la plante, suggérant un rôle barrière du champignon mycorhizien vis-à-vis du nickel. Dans cette étude, nous présentons également une description des populations bactériennes aérobies, hétérotrophes et résistantes au nickel, isolées des racines de deux espèces de *Costularia* inféodées aux maquis. Ces populations bactériennes sont de faible densité et dominées par les Protéobactéries. Certaines des souches isolées présentent une tolérance à 15 mM de nickel soluble et la capacité de solubiliser les phosphates.

L'avancement apporté dans les connaissances concernant la nutrition minérale des Cyperaceae et le rôle des microorganismes qui leur sont associés permettent d'envisager la mise en place en routine de champs semenciers productifs et l'utilisation des microorganismes associés aux *Costularia* dans les itinéraires techniques de restauration écologique pour en améliorer la réussite.

**Mots-clés :** Nouvelle-Calédonie, sols ultramafiques, Cyperaceae, *Costularia*, endémisme, fertilisation, mycorhizes, rhizobactéries, phosphore, nickel, restauration écologique.



Université de la Nouvelle-Calédonie  
Ecole Doctorale : Milieux Insulaires Ultra-Marins

THESE

Présentée par

Alexandre LAGRANGE

Pour obtenir le grade de  
Docteur en Sciences de l'Université de la Nouvelle-Calédonie  
Spécialité : Ecologie végétale et microbiologie

**ÉTUDES ÉCOLOGIQUE ET MICROBIOLOGIQUE  
DES ESPÈCES DU GENRE *COSTULARIA* (CYPERACEAE),  
PIONNIÈRES DES SOLS ULTRAMAFIQUES  
EN NOUVELLE-CALÉDONIE :  
PERSPECTIVES D'APPLICATION À LA RESTAURATION ÉCOLOGIQUE**

Soutenue publiquement le 11 septembre 2009 devant le jury composé de

Philippe Hinsinger	CR INRA, UMR 1222 Eco&Sols, Montpellier	Rapporteur
Sergio Miana de Faria	DR Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro Brazil	Rapporteur
Hamid Amir	Professeur, Université de Nouvelle-Calédonie	Directeur
Marc Ducousso	Chercheur CIRAD, UMR 113 LSTM, Montpellier	Co-directeur
Fabrice Colin	DR IRD, Centre de Nouméa	Examineur
Laurent L'Huillier	Chercheur IAC, Nouvelle-Calédonie	Examineur
Danielle Saintpierre	Chercheur Société Siras Pacifique, Nouméa	Examineur

Alexandre LAGRANGE

Thèse

2009





Université de Nouvelle-Calédonie  
Ecole Doctorale : Milieux Insulaires Ultra-Marins  
Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement

## **Thèse**

Présentée par  
**Alexandre LAGRANGE**

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université de Nouvelle-Calédonie

Discipline : écologie végétale et microbiologie des sols

TITRE DE LA THESE

**ÉTUDES ÉCOLOGIQUE ET MICROBIOLOGIQUE  
DES ESPÈCES DU GENRE *COSTULARIA* (CYPERACEAE),  
PIONNIÈRES DES SOLS ULTRAMAFIQUES  
EN NOUVELLE-CALÉDONIE :  
APPLICATION À LA RESTAURATION ÉCOLOGIQUE**

Soutenue publiquement le 11 septembre 2009 devant la commission d'examen :

Philippe Hinsinger	CR INRA, UMR 1222 Eco&Sols, Montpellier	Rapporteur
Sergio Miana de Faria	DR Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, Brazil	Rapporteur
Hamid Amir	Professeur LIVE, Université de Nouvelle-Calédonie	Directeur
Marc Ducousso	Chercheur CIRAD, UMR 113 LSTM, Montpellier	Co-directeur
Fabrice Colin	DR IRD, Centre de Nouméa	Examineur
Laurent L'Huillier	Chercheur IAC, Port Laguerre, Nouvelle-Calédonie	Examineur
Danielle Saintpierre	Chercheur Société Siras Pacifique, Nouméa	Examineur



## **Remerciements**

*Au terme de ce parcours tant passionnant qu'escarpé et avant d'exposer le fruit de cet effort collectif, il m'est particulièrement agréable de remercier tous ceux qui ont contribué à sa réalisation. Délectable et délicate tâche ! Je tiens donc à l'avance à m'excuser auprès de ceux qui seront déçus de ne pas y trouver leur nom.*

*Je tiens d'abord à remercier l'ensemble des acteurs de l'élaboration, du déroulement et du financement de ce projet :*

*Bernard Dreyfus, Fabrice Colin, Hamid Amir, Jacques Legueret, Marc-Henry Delrieu et Laurent L'Huillier pour l'élaboration,*

*Hamid Amir, Laurent L'Huillier, Michel Lebrun, Marc Ducouso et Jean-Paul Ambrosi pour le déroulement de ce travail, pour leur encadrement et pour les connaissances qu'ils m'ont transmises,*

*La société Siras Pacifique pour avoir financé une partie de ma bourse de thèse ainsi que certains travaux de recherche,*

*L'UMR 161 CEREGE (Centre européen de recherche et d'enseignement des géosciences de l'environnement) dirigée par Anicet Beauvais et l'UMR 113 LSTM (Laboratoire Symbioses Tropicales et Méditerranéennes) dirigée par Michel Lebrun pour leur contribution financière aux travaux de laboratoire,*

*Le laboratoire du LIVE de l'Université de Nouvelle-Calédonie dirigé par Hamid Amir qui m'a permis de participer à plusieurs Conférences Internationales d'Ecologie sur Serpentine (CIES),*

*Le programme de financement Sysmin de l'Union Européenne et la participation de la Province Sud de la Nouvelle-Calédonie pour leur aide au financement du projet de champ semencier expérimental.*

*Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Jean-Paul Ambrosi pour sa disponibilité, ses enseignements, son bon sens, sa générosité, son amitié. Un remerciement profond à Laurent L'Huillier qui a pris beaucoup de son temps pour m'initier aux disciplines où j'étais novice.*

*Je remercie vivement l'ensemble des participants aux travaux de laboratoire et de terrain :*

*Stagiaires, thésards, techniciens, ingénieurs et chercheurs des laboratoires associés à ces travaux : le LIVE (Valérie, Cindy, Fabrice, Nico, Yohan et Charly), le LSTM à Montpellier et à Nouméa (Philippe, Marc, Yves, Antoine, Clémence, Lionel, Odile, Laure, Clarisse, Mathieu, Loïc, Nathalie, Eddy et Caroline), les géologues de l'UMR 161 affiliée au CEREGE à Aix-en-Provence (Anicet, Robi, Jean-Lambert, Domi, Nico, Jean-Paul, Antoine, Violaine, Daouda, Nico) et le personnel de l'UMR AMAP, Laboratoire de Biologie et d'Ecologie végétale appliquées (Frédéric Rigault, Tanguy Jaffré, Gilles Dagostini, William, Laurette et Yahan).*

*Un grand merci également à l'Institut Agronomique néo-Calédonien et aux personnes qui m'ont aidé par l'intermédiaire de Laurent L'Huillier : Casimir Véra, Géraldine Derroire, Sophia et Mathieu et tout particulièrement Vanesse Labeyrie.*

*Le personnel de la société Siras Pacifique et particulièrement Jean-Louis Ruiz, Vincent et Thomas Gaillard, Danielle Saintpierre, Francesca, les stagiaires et les ouvriers de la pépinière.*

*Vincent Dumontet pour son initiation à la flore Calédonienne et Cyril Poullain, tous les deux ingénieurs de recherche du CNRS à Nouméa.*

*Je remercie l'ensemble du personnel et des temporaires de l'IRD de Nouméa qui ont partagé mon quotidien et m'ont supporté : Jacob, Marcel, Philippe, Denise, Jenny, Léo, Anne-So, Julien, Marion... Pour ne citer qu'eux.*

*Merci à mes parents sans qui rien ne serait possible, elle pour l'ensemble de son œuvre et lui pour ces constants conseils avisés. Merci à Noëlle Lagrange pour son*

*aide précieuse, à Pétro, Lanod, Gégé, Néné et Soso. Merci au Berry et aux Berrichons quelques soit leur couleur de peau.*

*Merci à Erica, Steeve, Cedric et la bande, Kasi, Denis, Daoud, Eric et Mag, JP, Charmant, Vivion, Anne-So, Lady Jane, Seb, les frères d'Ouvéa, Florent et Mélaine, Marie et Nico, mes collocs et toutes les autres Bobby sans qui mes doutes seraient restés muets. Merci à tous ceux avec qui j'ai partagé mon temps extraprofessionnel pendant ces quatre années, Vous êtes trop nombreux pour que je Vous cite, mais à Vous tous, je dédie ce travail. Une pensée particulière pour Nico et Henry, frères roux, guerriers valeureux à tout jamais présents, dont le départ prématuré m'a appris des choses de la vie...*

*Merci à ceux que j'oublie !*

*À tous, merci...*

Comme l'a déjà déclaré Nicolas, mon ami humaniste, lors de précédents travaux,  
*"Je ne suis ni Athénien, ni Grec, mais un Citoyen du Monde." Socrate*



## ***Avertissements***

Le contenu de cette thèse est bilingue. Les chapitres d'introduction et de conclusion, les chapitres deux et quatre sont rédigés en français alors que les chapitres un et trois sont rédigés en anglais du fait qu'ils sont publiés ou soumis à des revues scientifiques internationales.





# Sommaire

## INTRODUCTION

1. Contexte de l'étude .....	8
1.1. Contexte général .....	8
1.2. Contexte néo-calédonien.....	9
2. Problématiques et objectifs du travail de thèse.....	19
2.1. Problématiques .....	19
2.2. Objectifs .....	20

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Caractérisation écologique des écosystèmes de maquis sur sols ultramafiques :	
application à la restauration écologique des sites miniers.....	26
1.1. Les concepts de la restauration écologique.....	26
1.2. Principales étapes de la planification de la restauration des terrains miniers.....	27
1.3. Etat des connaissances des relations sol-plantes sur sols ultramafiques .....	29
2. Nutrition des plantes et dynamique de l'azote et du phosphore dans le système	
sol-plante .....	34
2.1. Généralités sur la nutrition des plantes.....	34
2.2. Biodisponibilité et dynamique du P dans le système sol-plante .....	35
2.3. Biodisponibilité et dynamique de l'azote dans le système sol-plante .....	37
2.4. Adaptation spécifique de l'acquisition du phosphore par les Cyperaceae :	
Rôle des racines "cluster".....	39
3. Rôle des microorganismes rhizosphériques dans l'adaptation des plantes aux	
contraintes édaphiques .....	43
3.1. Rôle des mycorhizes .....	43
3.2. Les bactéries rhizosphériques .....	53

## CHAPITRE 1.

### **Phytosociology and soil chemistry relationships on an ultramafic weathering sequence in the South-west of New Caledonia**

1.1. Introduction .....	64
1.2. Site description .....	66
1.2.1. Situation and climate .....	66
1.2.2. Vegetation and flora .....	66
1.2.3. Geology and soils .....	68
1.3. Materials and methods .....	69
1.3.1. Vegetation mapping .....	69
1.3.2. Soil sampling and chemical analysis .....	69
1.3.3. Statistical treatment .....	70
1.4. Results .....	71
1.4.1. Phytosociology .....	71
1.4.2. Soil geochemistry .....	74
1.4.3. Phytosociology versus soil geochemistry .....	80
1.5. Discussion .....	83
1.6. Conclusion .....	85

## CHAPITRE 2.

### **Réponses de *Costularia comosa* (Cyperaceae) aux fertilisations azotées et phosphatées : effets sur la croissance et le développement des plantes cultivées en plein champ dans des sols ferrallitiques de Nouvelle-Calédonie**

2.1. Introduction .....	94
2.2. Matériel et méthodes .....	96
2.2.1. Présentation du site d'étude .....	96
2.2.2. Description du plan expérimental .....	99
2.2.3. Acquisition des données .....	103
2.2.4. Exploitation des données : traitements statistiques .....	105
2.3. Résultats .....	107
2.3.1. Effet de la fertilisation sur la croissance des plants de <i>C. comosa</i> .....	107

2.3.2. Effet de la fertilisation sur le cycle de développement, le rendement et la germination des graines de <i>C. comosa</i> .....	112
2.3.3. Effet de la fertilisation sur la nutrition minérale des plants de <i>Costularia comosa</i> .....	120
2.3.4. Dynamique de l'azote et du phosphore dans les sols lors de l'essai de fertilisation .....	126
2.3.6. Analyse de la mycorhization des plants suivis .....	134
2.4. Discussion .....	138
2.5. Conclusion .....	142

## CHAPITRE 3.

### **New insights into the mycorrhizal behaviour of Cyperaceae. Role of arbuscular mycorrhizas in growth and adaptation of *Costularia comosa* in New Caledonian ultramafic soils**

3.1. Introduction .....	150
3.2. Materials and methods .....	152
3.2.1. Sites Survey .....	152
3.2.2. Plant root sampling for microscopic observation and molecular analysis .....	152
3.2.3. Staining, observation and characterization of root fungal colonisation .....	153
3.2.4. Molecular and phylogenetic analyses .....	153
3.2.5. Greenhouse experiment .....	153
3.3. Results .....	155
3.3.1. Field mycorrhizal survey .....	155
3.3.2. Molecular identification of a <i>Glomus</i> associated with AM in Cyperaceae .....	157
3.3.3. Effects of AM inoculation on <i>Costularia comosa</i> root colonisation, survival, growth and N, P, K and Ni contents .....	158
3.4. Discussion .....	160
3.4.1. New Caledonian Cyperaceae species are mycorrhized .....	160
3.4.2. Role of arbuscular mycorrhizas in <i>Costularia comosa</i> .....	161
3.4.3. Multiples strategies of New Caledonian pioneer sedge to colonize an adverse environment .....	162



## CHAPITRE 4.

### **Caractérisation et sélection de rhizobactéries tolérantes au nickel chez deux espèces de *Costularia* pionnières des sols ultramafiques**

4.1. Introduction .....	166
4.2. Matériels et Méthodes .....	168
4.2.1. Site d'étude .....	169
4.2.2. Échantillonnages et référencement du matériel biologique .....	170
4.2.3. Mise en évidence de l'activité réductrice d'acétylène dans la rhizosphère de <i>Costularia</i> .....	170
4.2.4. Dénombrement des populations microbiennes associées aux racines : flore totale et flore tolérante au nickel .....	171
4.2.5. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des souches bactériennes isolées des racines de <i>Costularia</i> .....	172
4.2.6. Caractérisation moléculaire des souches isolées .....	174
4.3. Résultats .....	176
4.3.1. Caractérisation des sols rhizosphériques .....	176
4.3.2. Détection de l'activité réductrice d'acétylène dans les rhizosphères de <i>Costularia</i> .....	177
4.3.3. Dénombrement des populations associées aux racines de <i>Costularia</i> .....	178
4.3.4. Diversité phénotypique des bactéries de la rhizosphère .....	179
4.3.5. Diversité fonctionnelle des bactéries de la rhizosphère .....	180
4.3.6. Diversité génétique des bactéries sélectionnées .....	185
4.4. Discussion .....	189
4.4.1. Densité des populations de rhizobactéries sur sols ultramafiques .....	189
4.4.2. Caractérisation de la tolérance au nickel des rhizobactéries .....	191
4.4.3. Diversité génétique globale des bactéries associées aux racines de <i>C. arundinacea</i> et de <i>C. nervosa</i> .....	191
4.4.4. Diversité génétique des bactéries associées aux racines intervenant dans la nutrition des <i>Costularia</i> .....	192
4.5. Conclusion et perspectives .....	194

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Nutrition minérale des <i>Costularia</i> dans les écosystèmes de maquis calédoniens sur roches ultramafiques .....	197
1.1. Géophytosociologie des Cyperaceae pionnières .....	197
1.2. Effet de la fertilisation le développement de <i>Costularia comosa</i> .....	198
1.3. Stratégies nutritives d'adaptation aux carences des sols ultramafiques des espèces du genre <i>Costularia</i> .....	199
1.4. Conclusion .....	202
2. Applications à la restauration des sites miniers : perspectives d'utilisation de microorganismes adaptés aux sols ultramafiques .....	203
 <i>Références bibliographiques</i> .....	205
<i>Listes des figures et des tableaux</i> .....	223
<i>Recommandations pour la restauration écologique des sites miniers</i> .....	231



## **INTRODUCTION**



# 1. Contexte de l'étude

## 1.1. Contexte général

Plus de 40% de la surface végétalisée de notre planète a été transformée par les activités humaines, principalement par le pâturage, l'exploitation forestation, l'agriculture, l'exploitation minière, l'urbanisation et l'industrialisation (Daily 1995). Les surfaces directement impactées par l'activité minière sont relativement faibles par rapport aux autres activités, mais peuvent représenter des surfaces considérables dans certains pays (Madagascar, Canada, Australie, Afrique du sud, Brésil, Etats-Unis, Chine...). Le développement mondial contemporain entraîne une demande croissante en matière première et en énergie, ce qui impose notamment de permettre un accès aux ressources minérales localisées dans les manteaux d'altération latéritique de la ceinture tropicale, principaux gîtes métallifères de la planète (Colin et al. 1992). Les sols ultramafiques issus de ces manteaux d'altération, caractérisés par des teneurs élevées en métaux et par de faibles teneurs en nutriments, ont engendré une biodiversité végétale spécifique et originale (Barthlott et al. 1996 ; Brooks 1987 ; Proctor 2003), souvent en danger d'extinction (Myers et al. 2000).

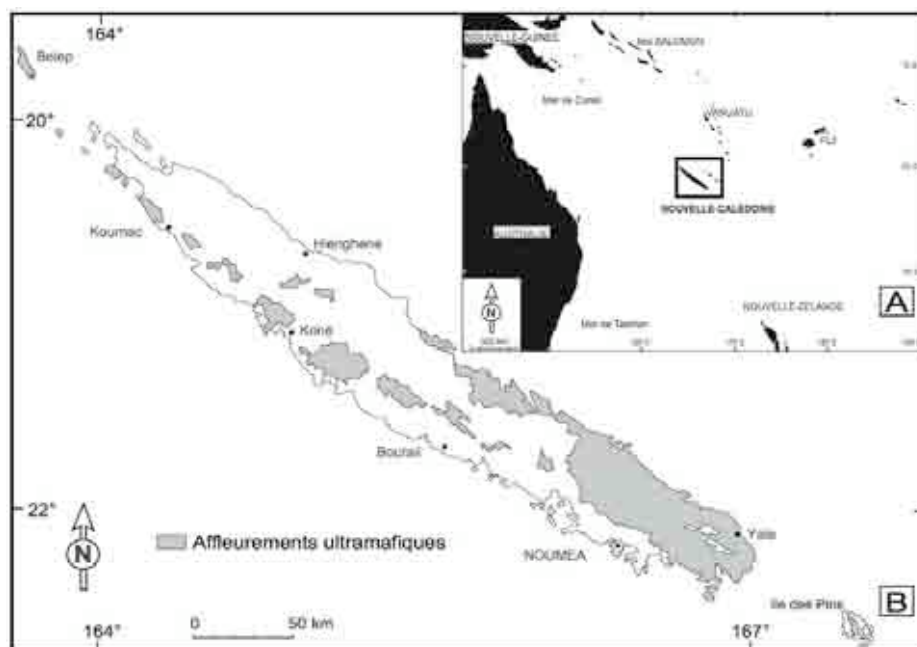
L'industrie minière à travers le monde a hérité d'une image peu flatteuse, ayant laissé à l'abandon nombre de dépôts de stériles, de fosses et autres ouvertures dangereuses qui ne s'accordent pas avec l'environnement et le concept de développement durable. Pourtant, les écosystèmes de la planète dans leur ensemble jouent un rôle essentiel dans la régulation des flux d'eau, de carbone et d'azote (Galloway et al. 2004) et à ce titre assurent aux sociétés humaines des fonctions indispensables liées au climat, à la qualité des sols, de l'eau et de l'air. Ces flux sont régulés par les activités de différents types d'organismes en interactions entre eux et avec le milieu (Frontier et Pichod-Viale 1991). Le concept de développement durable, initié par les pays du Nord, passe ainsi par la réhabilitation des écosystèmes dégradés, qui doit être faite en collaboration entre les sociétés spécialisées en réhabilitation, les groupes industriels exploitant les ressources, les populations locales et la recherche scientifique (Aronson et al. 2006). Il apparaît impératif de conserver la biodiversité de ces écosystèmes, de limiter les pollutions engendrées par le décapage des zones exploitées et d'approfondir les connaissances des processus écologiques complexes initiaux afin de pouvoir reconstituer une interface

entre les sols et les plantes proche de l'origine du point de vue de son fonctionnement (Dobson 2008).

## 1.2. Contexte néo-calédonien

### 1.2.1. Géographie

La Nouvelle-Calédonie est un archipel du Pacifique Sud situé juste au-dessus du tropique du Capricorne, 1500 km à l'Est de l'Australie et 1900 km au Nord de la Nouvelle-Zélande (Fig. 1). Elle est constituée d'une île principale, appelée la Grande-Terre et de plusieurs ensembles d'îles plus petites. La Grande-Terre s'étire du Nord-Ouest au Sud-Est sur près de 450 km en longueur et 40 à 70 km en largeur pour une superficie de 18 575 km<sup>2</sup>. Elle est presque entièrement entourée d'un récif de corail, isolant un lagon peu profond et très étendu à l'Ouest. Elle est traversée sur toute sa longueur par une chaîne montagneuse culminant au Mont Panié à 1628 m. Cette chaîne centrale sépare l'île en deux régions distinctes : la "Côte Est" exposée aux alizés, plus humide, possédant une végétation plus dense et des pentes abruptes et la "Côte Ouest" sous le vent, plus découpée, plus sèche, présentant de larges plaines favorables à la culture et à l'élevage alternant avec de riches massifs miniers.



**Figure 1.** (A) Situation de la Nouvelle-Calédonie dans le Sud-Est Pacifique. (B) Localisation des affleurements ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (en gris)

La Nouvelle-Calédonie bénéficie d'un statut administratif particulier déterminé par la loi organique n° 99-209 du 19 mars 1999, mise en place dans le cadre de "l'accord

de Nouméa" (Angleviel 2006). La Nouvelle-Calédonie est divisée en trois provinces (Province Nord, Province Sud, Province des Iles) dotées chacune d'une assemblée et formant ensemble le congrès de Nouvelle-Calédonie qui est l'assemblée délibérante. Les compétences environnementales sont sous la direction des provinces qui adoptent des dispositifs portant notamment sur les domaines de l'environnement minier.

### **1.2.2. Climat**

Le climat de la côte Est s'apparente au climat tropical humide semi-chaud, celui de la côte Ouest au climat tropical sec semi-chaud (Météo France NC 2008). L'archipel est situé à la limite sud de la zone intertropicale de convergence (entre 20° et 23° de latitude Sud) dans un secteur soumis à des dépressions cycloniques assez fréquentes. Ces mouvements de zones de basses pressions équatoriales et de hautes pressions subtropicales provoquent des variations climatiques saisonnières présentant d'une année à l'autre de fortes irrégularités. Quatre saisons peuvent cependant être reconnues : une saison chaude (mi-novembre à mi-avril) époque de cyclones et de pluies, une saison de transition (mi-avril à mi-mai) où la pluviométrie décroît, une saison fraîche ou "hiver austral" (mi-mai à mi-septembre) avec des températures minimales et enfin une autre saison de transition (mi-septembre à mi-novembre) souvent très sèche au cours de laquelle la température augmente. La température moyenne annuelle est de 23,5°C à Nouméa où les températures moyennes mensuelles varient de 26,2°C pour le mois de février à 19,9°C pour le mois d'août. La pluviométrie est influencée par l'exposition aux alizés du Sud-Est et par l'altitude. La pluviométrie moyenne annuelle est de 1700 mm, mais les précipitations annuelles varient considérablement d'un secteur à l'autre : moins de 1000 mm par an pour certains secteurs de la "Côte Ouest", à plus de 4000 mm au voisinage des sommets les plus élevés.

### **1.2.3. Économie**

La Nouvelle-Calédonie est connue pour l'importance de ses ressources en minerais nickelifères. Elle est le quatrième producteur mondial de nickel (13% de la production mondiale) et, selon les estimations actuelles, elle aurait plus d'un quart des ressources connues au monde. La production du nickel (Ni) est, de loin, la première ressource économique du Territoire avec environ 10% du PIB, bien qu'une

certaines diversifications soit recherchées dans d'autres secteurs d'activité (agriculture, aquaculture, tourisme...). De nos jours, le secteur minier et métallurgique représente environ 80% des exportations et fait du nickel la principale richesse du pays.

Dans un futur très proche, les minerais exploités en Nouvelle-Calédonie seront diversifiés, les opérateurs miniers également, et les surfaces décapées vont s'étendre en Province Sud comme en Province Nord. L'hydrométallurgie des minerais latéritiques accompagnera la pyrométallurgie des minerais silicatés, et deux usines vont être créées, à Goro et à Koné. Les avis sur un tel développement restent partagés, car le nickel est plus que jamais le centre des enjeux économiques, politiques, environnementaux et humains de la Nouvelle-Calédonie. Pour les plus optimistes, l'idéal serait de concilier développement, protection des identités locales, préservation de la nature et modernité. Un pari difficile mais néanmoins réalisable si tous les acteurs sociaux en présence consentent à choisir un destin commun pour l'archipel. Dans ces conditions l'exploitation du minerai se doit de combiner des intérêts économiques et écologiques.

#### **1.2.4. Géologie**

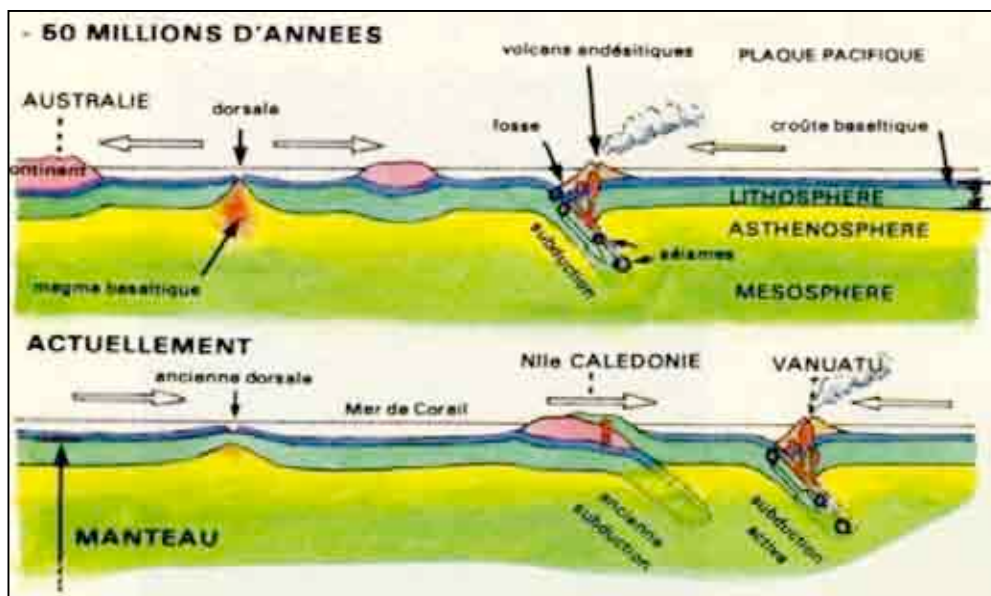
##### **1.2.4.1. Histoire géologique**

La Nouvelle-Calédonie (Grande-Terre) est un morceau de croûte continentale qui appartenait au supercontinent Gondwana, constitué entre autres de l'Australie et de l'Antarctique. Ce fragment s'est détaché à la fin du Crétacé (environ – 90 Ma) et a lentement dérivé vers l'Est, accompagné de la Nouvelle-Zélande et porté par la ride de Norfolk, grâce à une dorsale aujourd'hui inactive située entre la Nouvelle-Calédonie et l'Australie.

L'île, alors constituée de formations sédimentaires détritiques ou volcaniques sous-marines, subit à l'Eocène un événement géologique majeur : la plaque Indo-Australienne sur laquelle est située la Nouvelle-Calédonie se heurte à la plaque Pacifique et subducte, comme illustré figure 2. Lorsque la Grande-Terre atteint cette zone de subduction, la roche continentale commence à s'enfoncer, mais, du fait de sa faible densité, elle bloque le mécanisme et force au contraire les roches de la croûte océanique de la plaque Pacifique à la chevaucher. C'est ainsi que vers – 37 Ma, à l'Eocène supérieur, deux fragments de lithosphère océanique se retrouvent charriés sur le socle continental calédonien : c'est l'obduction des massifs basaltiques et de la nappe péridotitique (Picard 1999). Ensuite, cette nappe



péridotitique, qui se situe en surface, a permis la formation des sols et des écosystèmes ultramafiques couvrant une partie du territoire.



**Figure 2.** Coupes schématiques illustrant les étapes de formation de la Nouvelle-Calédonie, notamment les phénomènes de subduction et d'obduction

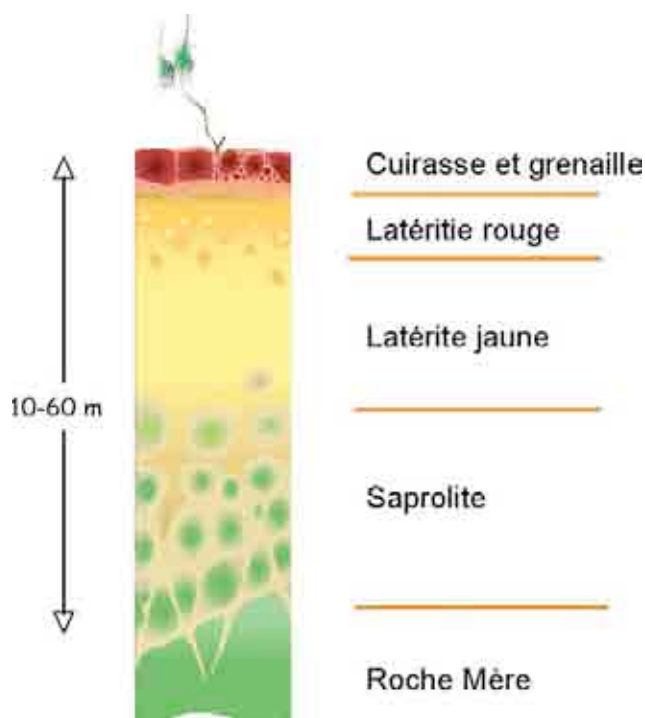
La subduction entre les deux plaques ayant été bloquée au niveau de la Nouvelle-Calédonie, une nouvelle zone d'activité se met en place en retrait dans le Pacifique, accompagnée de volcanisme encore très actif. La plupart des îles du Pacifique Ouest (Vanuatu, Tonga, Salomon, Wallis et Futuna...) ont une histoire plus récente que la Nouvelle-Calédonie car découlant de ce deuxième épisode de subduction encore très mouvementé aujourd'hui.

#### 1.2.4.2. Cadre géologique actuel

Les massifs de roches ultrabasiques, issues de la nappe péridotitique, qui recouvraient autrefois la totalité de la Grande-Terre ont subi une forte érosion et ne représentent plus aujourd'hui qu'un tiers de la surface de la Grande-Terre. Les restes de cette couverture de péridotites sont localisés principalement au sud et sud-est de l'île sur une grande superficie appelée "grand massif péridotitique du Sud", mais aussi au niveau de massifs isolés distribués sur toute la longueur de la côte Ouest et reposant sur les formations de basaltes (Fig. 1).

La péridotite, riche en Fer (Fe), en magnésium (Mg), en nickel (Ni), en manganèse (Mn), en cobalt (Co) et en chrome (Cr) est la roche mère ultramafique des gisements nickélifères (Latham 1985). Ces massifs péridotitiques sont donc le

support d'une activité minière extrêmement développée en Nouvelle-Calédonie et ce depuis plus d'un siècle (Jost 1998 ; Angleviel 2003 ; Lagadec 2004). Pour que le minerai se forme, il faut cependant que ces péridotites, dont la teneur en nickel est trop faible pour être exploitable, soient altérées par les efforts conjugués des agents climatiques, chimiques et biologiques (altération supergène), permettant la concentration de certains métaux. Ces accumulations forment ainsi les gisements dont le minerai est exploité dans des mines à ciel ouvert (Trescases 1975 ; Latham 1985). Cette altération supergène des roches ultramafiques entraîne la formation d'un profil caractéristique représenté dans la figure 3.



**La roche mère** (ou bed rock), dans laquelle les fractures vont favoriser le développement d'une altération pénétrante.

**La saprolite** (ou saprolite grossière), roche altérée à structure conservée où commence l'hydrolyse des silicates. La solubilisation des premiers éléments chimiques entraîne une diminution des teneurs en Mg et Si et une accumulation résiduelle du fer en contrepartie. Le nickel moins mobile peut donc se trouver concentré suite au départ des autres éléments. Il existe une altération graduelle entre les "saprolites rocheuses" encore cohérentes à la base de l'ensemble et les "saprolites terreuses" proches de l'état d'altération latéritique.

**La latérite jaune** (ou saprolite fine) est le 2ème stade d'altération des roches ultramafiques : Mg et Si n'existent quasiment plus, les oxy-hydroxydes de fer sont majoritaires, mais la structure de la roche reste encore reconnaissable. Le nickel est moins bien retenu par cet ensemble latéritique que par les saprolites. Les oxy-hydroxydes de fer cristallisent sous forme de goethites.

**La latérite rouge** correspond à des horizons remaniés majoritairement composés de goethite et d'hématite où les structures de la roche mère sont effacées.

#### **La cuirasse et la grenaille**

Ces horizons supérieurs d'altération sont issus du concrétionnement et de l'induration des oxy-hydroxydes de fer formant des matériaux durs aux couleurs rouge à noir. Cette cuirasse ferrugineuse peut être démantelée en nodules de tailles variables (pisolites ou grenaille).

Les processus conduisant à la concentration des métaux, et plus particulièrement du nickel, dans différentes phases minérales au cours de l'altération des péridotites sont doubles (Trescases 1975 ; Latham 1985) :

**La serpentinisation**, processus précoce d'altération à haute température, constitue une première étape de transfert des métaux des silicates primaires (olivine et pyroxène) vers les serpentines (Manceau et al. 1987). Ce départ privilégié de certains éléments conduit à un enrichissement résiduel en nickel dans les horizons inférieurs.

**L'altération supergène** intervient plus tard, lors de la mise à l'affleurement des formations ultramafiques. Exposées pendant plusieurs millions d'années à la chaleur et aux pluies du climat tropical, ces péridotites ont subi une intense altération géochimique formant d'épais manteaux d'altération dit latéritiques. La majorité des minéraux primaires est transformée par hydrolyse et entraîne une destruction partielle ou totale des silicates, accompagnée de transfert de métaux (Singh et al. 2002). Une partie des éléments est ainsi lixiviée dont le magnésium et le silicium. Cette mobilité différentielle des éléments conduit à des gradients chimiques dont le rapport  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{MgO}$  témoigne du degré d'altération, d'autant plus élevé que le rapport est grand. Lors du phénomène d'altération, la roche se dissout, le nickel présent en faible teneur (inférieur à 0.5%) a été libéré et mis en solution permettant sa circulation dans les fractures de la roche et sa concentration dans les horizons inférieurs, où il se fixe sur les minéraux des saprolites comme la garniérite et les latérites jaunes (formation de minerai nickélicifère).

**Figure 3.** Profil typique de l'altération latéritique sur péridotite

### 1.2.5. Environnement en milieux "miniers"

Les écosystèmes sur roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie occupent 5500 km<sup>2</sup> (Fig. 1). Leur isolement géographique, la présence de métaux à des concentrations très élevées dans les sols et leur faible fertilité ont favorisé l'émergence d'écosystèmes originaux adaptés à ces fortes contraintes édaphiques (Brooks 1987 ; Jaffré 1980 ; Lee et al. 1977 ). La Nouvelle-Calédonie, classée "hot spot" mondial pour sa biodiversité (Myers et al. 2000), possède une des flores les plus riches et originales de la planète : on recense sur ce territoire de 18500 km<sup>2</sup> plus de 3250 espèces de plantes à fleurs dont 74,5% sont endémiques (Jaffré et al. 2001a). Sur les sols ultrabasiques, le niveau d'endémisme est encore plus élevé, atteignant 85% (Morat et al.1986).

En Nouvelle-Calédonie, la sensibilité naturelle des sols ultramafiques à l'érosion, résultant de la combinaison de paramètres naturels (topographie, pluviométrie et altération des substrats), est aggravée par des paramètres anthropiques (feux de végétation successifs et prospections minières à ciel ouvert). Depuis environ le milieu du XXe siècle, les exploitations minières dégradent le patrimoine écologique de la Nouvelle-Calédonie ; elles ont laissé de nombreuses mines orphelines sujettes à l'érosion. L'impact de ces exploitations sur l'environnement a rapidement pris de l'ampleur avec la mécanisation. À l'heure actuelle, les techniques modernes de prospection des compagnies minières sont sensiblement plus respectueuses de l'environnement. Cependant le décapage de vastes surfaces pour les routes d'accès et de prospections, les mines elles-mêmes, et le stockage des déchets stériles de minerais laissent de trop nombreuses lésions environnementales non "cicatrisées", sans compter que de nouveaux projets miniers de grande envergure sont actuellement à l'étude. Les répercussions négatives sont doubles : d'un côté, la destruction et le risque de perdre des écosystèmes d'une exceptionnelle richesse floristique et de l'autre, l'augmentation des surfaces décapées vulnérables à l'érosion, sources de pollution chimique et d'hypersédimentation pour les rivières et le lagon (Sarraiilh et Ayrault 2001).

La réhabilitation des sites miniers demeure en terme d'environnement, l'une des contraintes majeures de l'exploitation minière (Jaffré et al. 1994, 1997). Les méthodes d'exploitations minières soucieuses de l'environnement sont d'application récente. Les techniques actuelles limitent au plus juste les ouvertures de chantiers

de prospection et d'extraction (Pelletier 2003). Elles évitent aussi au mieux la pollution des rivières par les matériaux latéritiques fins en contrôlant les eaux de ruissellement à l'aide de caniveaux et de décanteurs. De même la dégradation de la couverture végétale des versants limitrophes des zones décapées est également réduite par la présence de merlon et la stabilité des stériles stockées en verse. Mais la reconstitution d'un écosystème végétal viable servant de protection durable contre l'érosion reste problématique.

## **1.2.6. Revégétalisation et restauration écologiques des sites miniers**

### **1.2.6.1. Revégétalisation des sites miniers calédoniens**

Il est nécessaire au préalable de bien comprendre les difficultés majeures de la revégétalisation eu égard à l'état des terrains miniers qu'il va falloir réhabiliter. Dans la plupart des cas, il s'agit de roches mises à nu et de terrains stériles où aucune plante n'est capable de se développer pendant plusieurs décennies.

Depuis les années 70, des travaux de revégétalisation sur sols ultramafiques ont été conduits par des équipes scientifiques implantées sur le territoire, en relation avec les sociétés minières et les Provinces de Nouvelle-Calédonie (Jaffré et Pelletier 1992). Après de nombreux échecs de revégétalisation avec des espèces mal adaptées aux sols ultramafiques, les premiers essais de restauration écologique (Jaffré et al. 1997 ; Luçon et al. 1997 ; Sarrailh 2002 ; Sarrailh et Ayrault 2001) se sont essentiellement appuyés sur les travaux de botanique et d'écologie végétale (Baker et al. 1992 ; Brooks 1987 ; Jaffré 1980 ; Jaffré et Latham 1974). Ils ont produit des résultats qui à l'évidence traduisent la nécessité d'une meilleure connaissance du fonctionnement de l'interface sols/plantes de ces écosystèmes à fortes contraintes et de la nécessité de mises au point méthodologiques de revégétalisation avec les plantes endémiques.

Ces recherches en écologie végétale ont montré l'existence d'espèces endémiques qualifiées de pionnières ou cicatricielles des sites dégradés (Jaffré et Pelletier 1992). Ainsi la famille des Cyperaceae, étudiée dans ce travail de thèse, présente plusieurs espèces inféodées au maquis, capables de coloniser les terrains dénudés par l'érosion naturelle ou l'activité anthropique. Parmi ces espèces, on peut noter la présence de quatre genres principaux *Beaumea*, *Lepidosperma*, *Schoenus* et enfin le genre *Costularia* qui concerne plus précisément nos travaux. L'utilisation de ces espèces endémiques et pionnières, adaptées aux sols ultramafiques, est

maintenant préconisée en revégétalisation minière, afin d'initier, d'amplifier et d'accélérer le phénomène de colonisation végétale primaire des terrains. À l'heure actuelle, trois techniques de revégétalisation sont utilisées (Luçon et al. 1997 ; Pelletier 2003) :

- La technique d'ensemencement ou semis hydraulique (hydraulic-seeding). Ce procédé, qui consiste à projeter, sur les surfaces à revégétaliser, à l'aide d'un hydro-semoir (pompe montée sur un camion) un mélange de mulch, de colle végétale, de nutriments, d'engrais minéraux et organiques et de semences de diverses espèces. Il semble être la meilleure solution pour revégétaliser les talus. L'objectif est de fixer les sols rapidement avec les graminées qui serviront également d'espèces nurses pour favoriser la germination et l'implantation d'une strate herbacée résistante à base d'espèces endémiques capables de relancer la dynamique de la végétation et à terme par succession naturelle secondaire (Potée 2008).
- La plantation d'espèces endémiques pionnières des sites miniers dégradés. Elle est effectuée principalement sur les talus, les décharges ou encore sur les anciens sites d'exploitation. Les espèces plantées sont élevées en pépinière à partir de graines collectées dans le milieu naturel. Ces espèces utilisées sont dites cicatricielles des maquis miniers et sont censées permettre d'amorcer une succession végétale secondaire.
- L'utilisation du "top-soil" récupéré sur les terrains décapés. Le top-soil est la couche superficielle du sol, contenant la matière organique, les réserves de graines ainsi que les microorganismes du sol.

#### **1.2.6.2. Restauration écologique**

L'ensemble des participants au colloque international, "*Préservation et restauration écologique en milieu tropicale minier*" à Nouméa en 2003, a été d'accord pour souligner que les méthodes de restauration sur des sites aussi difficiles nécessitent encore beaucoup de recherches fondamentales. Certaines recommandations scientifiques ont été abordées, elles concernent la connaissance de l'écosystème naturel des plantes pionnières :

- Des études doivent être menées sur la composition, la structure phytosociologique et le fonctionnement des plantes : phénologie (Derroire et al. 2008), germination (Wulff et al. 2008) et physiologie de développement.

- La disponibilité du sol en semences et en éléments nutritifs ainsi que le rôle des populations de micro-organismes symbiotiques associés à la rhizosphère des plantes doivent être caractérisés. Le suivi des travaux de revégétalisation et de réparation de l'écosystème est une phase importante qui n'est que trop rarement effectuée, alors que plusieurs indicateurs traduisant l'évolution du milieu peuvent être identifiés (productivité et diversité végétale, biomasse microbienne, abondance des mycorhizes etc.).
- Un suivi et une meilleure gestion des sites restaurés permettraient aussi d'améliorer les techniques et la réussite des travaux. Les compagnies minières et les scientifiques s'accordent à dire que des efforts sont à faire sur le recyclage des sols de surface. Ils n'ont certes pas de valeur marchande, mais ils sont au cœur du problème de la restauration écologique car ce sont eux qui vont permettre la reconstitution d'un sol favorable à la croissance des plantes.

Les démarches de la restauration écologique des sites miniers consistent à planter un premier couvert de végétation résistante, pérenne, à base d'espèces natives colonisatrices des terrains dénudés. Ce couvert végétal de plante pionnières doit être capable à terme d'amorcer les phénomènes de succession secondaire conduisant progressivement à des groupements végétaux plus complexes et plus diversifiés. Chaque stade évolutif est constitué d'un noyau d'espèces fondamentales qui y réalisent leur développement optimum. Les caractéristiques fonctionnelles essentielles de l'écosystème peuvent être reconstituées assez rapidement, alors que la restauration intégrale de l'écosystème peut exiger des centaines d'années. Mais les problèmes majeurs restent la qualité physique, chimique et biologique des substrats à revégétaliser, la disponibilité des graines de plantes endémiques originaires des sites à revégétaliser et la germination sur sites de ces espèces endémiques qui est lente et difficile. La technique consistant à améliorer les substrats latéritiques et garniéritiques en recouvrant les terrains miniers par des matériaux de surface (top-soil) plus propices à la croissance des plantes reste une méthode insuffisamment mise en pratique en raison d'obstacles techniques, de surcroît coûteuse et encore expérimentale, mais très prometteuse en termes de résultats.

## **2. Problématiques et objectifs du travail de thèse**

L'un des challenges majeurs de la Nouvelle-Calédonie est d'arriver à concilier l'exploitation minière et la pérennité de son patrimoine biologique exceptionnel. C'est là l'originalité et toute la difficulté du développement durable pour la Nouvelle-Calédonie. Le but des recherches menées en Nouvelle-Calédonie sur la revégétalisation est de trouver des itinéraires techniques permettant de mettre en place un recouvrement végétal par des espèces pionnières colonisatrices primaires afin d'amorcer les phénomènes de succession écologique à des prix réalistes. Les projets de restauration en Nouvelle-Calédonie en sont à la caractérisation fonctionnelle des écosystèmes et n'ont pas encore clairement fixé les cibles matérielles à atteindre.

### **2.1. Problématiques**

Le processus naturel de colonisation par les plantes endémiques des zones dégradées est très lent. Le rôle de la restauration écologique sera donc d'accélérer l'implantation primaire des espèces pionnières. Pour cela, il est nécessaire de connaître les modes de nutrition des espèces de Cyperaceae préconisées en restauration des maquis miniers et de connaître les interactions écologiques entre les organismes à l'interface sol-plante (zone définie comme la rhizosphère) afin de pouvoir recréer au mieux les conditions optimales de croissance.

La nutrition végétale est l'ensemble des processus qui permettent aux végétaux d'absorber dans le milieu ambiant et d'assimiler les éléments nécessaires à leurs différentes fonctions physiologiques : croissance, développement, reproduction. L'azote et le phosphore sont fortement limitants dans les sols dérivés de roches ultramafiques où leurs teneurs apparaissent très faibles (1/10 à 1/100 des teneurs moyennes habituellement constatées dans les sols fertiles). Dans ce contexte, la caractérisation et la maîtrise des microorganismes rhizosphériques associés à la nutrition des Cyperaceae pionnières sont fondamentales. Les interactions entre les trois compartiments (sol-microorganismes-plantes) dans les milieux ultramafiques de Nouvelle-calédonie sont mal connues.

La végétalisation par la technique du semis hydraulique est particulièrement bien adaptée pour le traitement de vastes pentes souvent peu accessibles. Elle a déjà fait la preuve de son efficacité dans de nombreux pays. Toutefois, en Nouvelle-



Calédonie, cette méthode est fortement entravée par les problèmes d'approvisionnement et de germination des semences endémiques. Un minimum de 3000 graines au m<sup>2</sup> est utilisé pour des taux de réussite variés en termes de germination, représentant près de 40% du prix du semis hydraulique. Actuellement, le seul moyen d'obtention de semences des espèces natives est leur collecte directe dans la nature. Cette étape, bien qu'indispensable, ne permet de disposer que de quantités de graines limitées et à un prix de revient très élevé. La nécessité impérieuse de produire en plein champ des semences en quantité supérieure par la mise en place de vergers à graines (ce que nous développons au sein de la société Siras Pacifique et de l'Institut Agronomique néo-Calédonien) a également été une des préconisations du Colloque International, "*Préservation et restauration écologique en milieu tropicale minier*" à Nouméa de 2003. Dans un futur proche, les besoins en semences seront encore plus importants, il faudra au plus vite mettre au point des techniques culturales pour ces Cyperaceae endémiques non encore cultivées en plein champ et mieux connaître la biologie de leur nutrition.

Une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE), ayant pour objet de promouvoir les plantes endémiques et leurs micro-organismes associés dans les procédés de revégétalisation, a permis ce travail de thèse. Elle a été établie pour la réalisation de ce travail de thèse, dans le cadre d'une collaboration entre une entreprise spécialisée en environnement et dans la revégétalisation des sites miniers (SIRAS Pacifique) et un groupement de recherche, constitué d'écologues (IRD, CIRAD), de géochimistes (CEREGE), d'agronomes (IAC), et de microbiologistes des symbioses (UNC et LSTM).

## **2.2. Objectifs**

Il sera d'abord exposé une revue détaillée de nos connaissances actuelles sur les écosystèmes des sols ultramafiques et sur l'adaptation nutritive des Cyperaceae endémiques aux exigences propres des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie.

Nous envisagerons ensuite l'étude de la relation sol-plante au sein des écosystèmes de maquis sur sols ultramafiques qui sont, comme nous l'avons vu, caractérisés par de fortes contraintes. La diversité pédologique influence la biodiversité, particulièrement celle de la végétation et des organismes associés.

L'étude qualitative et quantitative de ces relations entre diversité pédologique et végétale dans les maquis miniers passe par l'analyse de la diversité le long d'un gradient de stress ou de perturbation (Grime 1979 ; Tilman 1994). Le stress peut provenir des conditions du sol, de sa fertilité chimique, de la disponibilité des éléments nutritifs (azote, phosphore, potassium et équilibre Ca/Mg, etc.) mais aussi, dans ces milieux riches en métaux, de la présence d'éléments toxiques disponibles à des degrés variables pour les plantes et les microorganismes associés. Dans ces conditions extrêmes, nous nous proposons d'étudier l'écologie des Cyperaceae pionnières le long d'une toposéquence d'un versant du Massif du Sud. Il s'agira d'établir des relations entre la phytosociologie des groupements à strate de Cyperaceae et la diversité fonctionnelle des sols. Comment la biodisponibilité des éléments métalliques en trace ou des éléments nutritifs influence-t-elle l'organisation des formations végétales ?

Dans une troisième phase, nous considérerons la mise en place de champs semenciers expérimentaux. Depuis 2006, la société SIRAS Pacifique et l'Institut Agronomique néo-Calédonien visent à produire des graines d'espèces de Cyperaceae pionnières non encore cultivées, pour leur utilisation dans la revégétalisation des terrains miniers. Sur des sols ferrallitiques ferritiques colluvionnés, différents traitements de fertilisation azotée et phosphatée ont été entrepris en plein champ sur *Costularia comosa* (C.B.Clarke) Kük., espèce cicatricielle à large répartition géographique et écologique. Le but de ces travaux est de déterminer les conditions optimales de culture en termes de croissance et de production de graines, et d'acquérir directement par l'expérience de terrain les connaissances et le savoir-faire relatifs aux pratiques culturales les mieux adaptées.

Enfin nous explorerons successivement les partenaires fongiques et bactériens liés à la rhizosphère de quelques espèces du genre *Costularia*, pionnières des maquis. La présence d'une microflore à l'interface sol-plante, souvent spécifique de la plante hôte, a déjà été mise en évidence (Hery et al. 2005b ; Mercky 1999 ; Perrier et al. 2006b). Dans ce cadre, nous étudierons, d'abord en condition naturelle, quel est le statut mycorhizien de ces Cyperaceae pionnières, et dans un second temps, en condition contrôlée, quel est le rôle de ces mycorhizes dans la survie et la croissance de *Costularia comosa*. Pour ce qui concerne les rhizobactéries

cultivables, nous déterminerons quelle est leur diversité génétique, et enfin nous nous attacherons à établir quelle est l'aptitude fonctionnelle de ces bactéries à résister à de fortes concentrations en nickel, à solubiliser le P complexé dans les sols et à fixer l'N de l'air.





## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **1. Caractérisation écologique des écosystèmes de maquis sur sols ultramafiques : application à la restauration écologique des sites miniers**

## **1.1. Les concepts de la restauration écologique**

La forte dégradation des milieux liée aux activités humaines a suscité depuis plusieurs décennies diverses initiatives de restauration (Harris et al. 2006). Certains chercheurs, conscients de la complexité des écosystèmes, de la difficulté à comprendre les mécanismes et processus en jeu dans leur fonctionnement, ont parfois manifesté des réticences aux tentatives de description et conceptualisation de leur évolution (Andreasen et al. 2001). Cependant, la situation semble évoluer dans un sens favorable car il est de plus en plus reconnu que les procédures d'évaluation de la restauration doivent s'appuyer sur l'expérimentation pour être crédibles d'un point de vue scientifique et sur des résultats provenant de la modélisation du fonctionnement des systèmes biologiques pour être réellement prédictifs. Cette tendance se trouve confortée par les publications des revues spécialisées et la tenue de symposiums internationaux permettant les échanges entre experts dans ce domaine.

L'écologie de la restauration s'adresse à l'ensemble des processus naturels et assistés par les interventions initiant ou favorisant le rétablissement des écosystèmes dégradés, endommagés ou détruits (SER 2002). Les objectifs de la restauration sont de "réparer" les processus écologiques, la productivité et l'intégrité biologique initiale d'écosystèmes "dégradés". Mais, les concepts théoriques et paradigmes de cette discipline scientifique sont encore jeunes, tout comme les techniques mises en oeuvre dans le cadre de l'ingénierie écologique.

Différents termes sont utilisés pour définir ce qui a été proposé dans les objectifs des projets de restauration. Le terme *restauration écologique* se réfère à la réinstallation de l'écosystème original dans sa structure et sa fonction. Le terme *réhabilitation* est utilisé pour indiquer la réparation des processus de la productivité et des services de l'écosystème et le terme *remise en place* est la création d'un écosystème alternatif (Bradshaw 1984, 1990). En ce qui concerne la perturbation engendrée par l'exploitation minière, les sols, la flore et la faune sont détruits par le

décapage des horizons de surface. Il faut donc considérer la revégétalisation des carrières et des décharges à stériles minières comme une reconstruction d'écosystème, c'est-à-dire rétablir la capacité d'un terrain à capter et retenir les ressources fondamentales (eau, nutriments, sols, espèces...). Dans cette étude, le terme général *restauration* reflétant la littérature actuelle sera utilisé. La possibilité de l'appeler *écologique* n'est faisable qu'à la fin du suivi permettant d'évaluer la réinstallation des organismes et des fonctions de l'écosystème souhaité.

## **1.2. Principales étapes de la planification de la restauration des terrains miniers**

La restauration consiste à employer des alternatives pour couvrir, amender et améliorer le terrain à revégétaliser et apporter les stocks de graines et de microorganismes nécessaires à la reconstitution d'un sol. Les programmes de restauration des trente dernières années indiquent que la considération prépondérante est l'apport ou non de sol de surface (top-soil) qui correspond à la couche supérieure du sol contenant la matière organique, les microorganismes et le stock de semences (Johnson et Bradshaw 1979 ; Bradshaw 1990). Cooke et Johnson (2002) présentent un modèle des principales étapes de planification selon lequel la présence ou l'absence de sol fertile conservé sur le site reçoit le statut de problématique pratique primaire en vue de la restauration écologique liée à l'exploitation des minerais métallifères. L'utilisation du top-soil déterminera la rapidité de reconstitution d'un écosystème équilibré et déterminera si cette reconstitution est écologiquement proche du système originel, en favorisant la recolonisation rapide par les espèces originelles. À l'inverse, le recouvrement par la végétation des surfaces mises à nu implique souvent une chronologie de colonisation qui est en fait très différente de la végétation environnante parce que les propriétés physiques et chimiques de ces substrats sont très différentes des sols originaux.

Ainsi, par la mise en évidence de l'importance des dynamiques spatio-temporelles (Luken 1990), les opérations de restauration d'écosystèmes sont maintenant considérées comme des "procédés" orientés par les connaissances écologiques et la recherche, et non plus seulement comme les moyens de fournir un "produit" : le système restauré (Cooke et Johnson 2002). Les objectifs de la restauration sont donc en général la reconstitution d'un couvert végétal par la colonisation primaire d'espèces pionnières capables d'entraîner des successions



végétales secondaires par des espèces indigènes des terrains dégradés (Bradshaw 1997). Les successions sont une description des changements de végétation à différentes échelles dans l'espace et le temps. Les organismes à caractère pionnier colonisent les sites dénudés, donnant lieu à une communauté pionnière. Celle-ci transforme graduellement son milieu, créant de nouveaux habitats pour abriter d'autres espèces. La communauté pionnière n'est donc pas durable car sa composition est appelée à évoluer rapidement. Plusieurs communautés de plus en plus complexes se succèdent jusqu'à ce qu'une communauté climacique s'établisse (Luken 1990). Cette dernière se caractérise par une biodiversité élevée et une composition plus ou moins constante, elle est donc durable.

D'une façon générale, l'examen du succès des programmes de restauration écologique dépend du suivi et de l'évaluation des dynamiques écologiques sous diverses contraintes. L'échelle de temps est souvent longue, particulièrement dans la phase initiale de colonisation, phase durant laquelle des procédés doivent être développés pour accélérer la colonisation primaire qui permettront d'éviter l'érosion des sols. Les dispositifs permettant d'aboutir à une évaluation du succès d'une opération de restauration devraient être pris en compte dès la conception de tout projet et intégrés aux différentes étapes de son déroulement (Kentula 2000 ; National Research Council 1992 ; SER 2002). Le défi est donc de déterminer des paramètres dans le cadre d'un suivi dont les mesures sont relativement simples pour être efficaces, à des coûts raisonnables, et d'homogénéiser ces suivis afin de pouvoir les comparer (Bazin et Barnaud 2002 ; Henry et al. 2002 ; Zedler et Weller 1990). Le suivi et l'évaluation sont deux notions qui se complètent (Dale et Beyeler 2001). Le suivi est un domaine bien connu et maîtrisé par le scientifique : cela fait partie intégrante de la notion d'expérimentation, qui est au cœur de l'activité de recherche, notamment en écologie (Lubchenco et Real 1991). D'ailleurs, la restauration est perçue comme une opportunité remarquable d'expérimenter en vraie grandeur les systèmes écologiques et de traiter de leur complexité (Barnaud 1995 ; Bradshaw 1997 ; Jordan 1988 ; Jordan et Packard 1989).

## **1.3. Etat des connaissances des relations sol-plantes sur sols ultramafiques**

### **1.3.1. Les sols**

Les paysages latéritiques sont le résultat de l'altération géochimique des roches ultramafiques (Fig. 3), mais aussi de la dissection de ce manteau d'altération par les mécanismes d'érosion (Latham 1985 ; Chevillotte et al. 2006). Il en découle une forte diversité des sols dérivés de ces roches possédant cependant des caractéristiques communes (Forte teneur en métaux, faible teneur en nutriments majeurs, déséquilibre Ca/Mg) (Latham et al. 1978 ; Brooks 1987). Deux catégories principales de sols ont été reconnues sur roches ultrabasiqes de Nouvelle-Calédonie, les sols bruns eutrophes hypermagnésiens et les sols ferrallitiques ferritiques ou oxisols (Jaffré 1980 ; Proctor 2003). Les sols bruns hypermagnésiens se trouvent à la base des massifs de roches ultrabasiqes. Ils correspondent à un étage où la pédogenèse est marquée par une recombinaison de la silice du fer et du magnésium. Les sols ferrallitiques-ferritiques, sur lesquels nos études sont réalisées, sont les mieux représentés sur les massifs de roches péridotitiques, et sont composés aux trois quarts d'oxyde et d'hydroxyde de fer. Ils sont le résultat d'une pédogenèse ancienne et marquée par des cuirassements et des remaniements successifs. Il en découle toute une gamme de sols plus ou moins indurés ou cuirassés, plus ou moins érodés ou colluvionnés qui couvrent de larges surfaces dans le Grand Massif du Sud (Latham et al. 1978 ; Jaffré 1980 ; Bonzon et al. 1997).

Ces sols ferrallitiques-ferritiques contiennent de fortes concentrations en divers éléments pouvant s'avérer toxiques pour les organismes (nickel, chrome, manganèse, cobalt) (Brooks 1987). Ils contiennent d'assez faibles concentrations en nutriments essentiels pour les plantes tels que l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca) et un rapport calcium/magnésium (Ca/Mg) faible, défavorable à une bonne assimilation du calcium par les plantes (Brady et al. 2005).

La disponibilité des éléments chimiques pour les plantes ne dépend pas que de leur quantité globale dans le sol, mais surtout de leur mobilité, fonction des conditions physico-chimiques ambiantes qui varient en relation notamment avec la position du sol dans le profil d'altération et la toposéquence (amont bien drainé, aval rédoximorphe) (Bourdon et al. 1997 ; Quantin et al. 2002). Dans le sol, les éléments métalliques peuvent exister sous forme de cation libre en solution ou sous forme liée

à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme de cation libre ou pouvant le devenir, il est alors biodisponible. Certains métaux indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires (par exemple 1/3 des enzymes connues contiennent un ion métallique fonctionnel), deviennent toxiques lorsqu'ils sont présents à fortes concentrations. On parle de micronutriments. C'est le cas du Co, du Cu, du Ni, du Zn, du Fe... Par exemple, le nickel, indispensable au fonctionnement de certaines enzymes inhibe la croissance de la plupart des bactéries lorsqu'il est présent à des concentrations de l'ordre du millimolaire. La biodisponibilité d'un métal, directement liée à sa toxicité, est conditionnée par deux facteurs principaux du sol : sa teneur en argile et en matière organique généralement chargée négativement, directement liée à la capacité d'échange cationique et son pH dont la diminution influence la solubilité des ions métalliques. La mobilité des métaux dans les sols est rendue possible par transformation chimique, par lixiviation et par chélation biologique, menant à la dissolution des éléments métalliques ou à leur désorption de sites d'échange.

Au sein des sols ultramafiques, les deux éléments les plus abondants sous une forme soluble et les plus toxiques pour les plantes sont le Ni et le Mn. Des études montrent l'existence de variations très importantes dans la biodisponibilité du Ni dans les sols ferrallitiques en relation avec sa position dans la toposéquence et l'horizon de surface (Becquer et al. 1997 ; L'Huillier et Edighoffer 1996 ; Perrier et al. 2006b). Les phosphates diffusent très lentement dans la solution du sol, ils sont rapidement adsorbés sous formes de phosphates d'aluminium ou de fer dans les sols à faible pH et forte teneur en oxydes métalliques tels que les sols ultramafiques. Comme ces composés sont très peu solubles, les concentrations de P dans les solutions du sol excèdent rarement 10  $\mu\text{M}$ . Au contraire, les composés azotés inorganiques sont en général solubles, le nitrate est très mobile et atteint parfois des concentrations de l'ordre du mM. Lorsque le sol vieillit, l'altération, l'érosion, le lessivage et la dénitrification conduisent à une diminution de sa teneur en nutriments (Lambers al. 2008), l'azote et le phosphore peuvent alors devenir fortement limitants. Les plantes habitant ces sites, outre les désavantages chimiques (excès de métaux et manque de nutriments), doivent souvent résister à la sécheresse et à des températures élevées du sol dues à la couverture végétale éparse et à la forte insolation. Tout ceci illustre les effets des facteurs édaphiques auxquels les plantes doivent s'adapter.

### 1.3.2. La végétation sur sols ultramafiques

La végétation néo-calédonienne sur sol ultramafique est une mosaïque de formations forestières et para-forestières résiduelles, restreintes à des zones humides et à des sites topographiques protégés. Ces formations forestières sont entourées par des formations de maquis plus ou moins basses sur des surfaces plus étendues que celles des forêts elles-mêmes (Jaffré 1992, Proctor 2003, Read et al. 2006). L'écologie des systèmes ultramafiques est particulièrement originale étant donné le haut pourcentage de plantes endémiques, les adaptations morphologiques des plantes et les structures particulières des communautés végétales (Jaffré 1980). La classification phytosociologique et phytogéochimique réalisée par Jaffré (1980) a permis d'organiser les maquis selon 3 typologies principales qui diffèrent ensuite dans leur composition floristique, "*maquis arbustif*, *maquis buissonnant*, *maquis ligno-herbacé*".

Les maquis se développent dans des conditions climatiques très variées. En effet, ces formations, qui occupent 90% des terrains ultramafiques, s'étendent du niveau de la mer jusqu'au plus haut sommet, dont la pluviométrie annuelle peut fluctuer de 900 à 4000 mm. Elles occupent généralement d'anciennes zones forestières qui ont régressé durant les derniers siècles à la suite de feux successifs (Jaffré et al. 1998 ; McCoy et al. 1999). Leur configuration physionomique et leur composition floristique très variées montrent souvent des zones de transition bien marquées reflétant les variations des facteurs écologiques stationnels : sol, pluviométrie, altitude, érosion par glissement de terrain, action du feu et stade d'évolution après incendie. Ainsi, la flore des maquis totalise environ 1140 espèces de plantes vasculaires, dont plus de 88% sont endémiques de la Nouvelle-Calédonie (Morat et al. 1986). L'étude de l'organisation écosystémique et la conservation de ce type de formation végétale sensible, qui regroupe 35 % des espèces du territoire, doit être une priorité face aux dégradations anthropiques actuelles.

Les études phytosociologiques des phénomènes de succession secondaire, correspondant à des études d'évolutions structurelles des végétations, ont été réalisées par Jaffré (1980) et par McCoy et al. (1999). Elles ont démontré que les maquis arbustifs ouverts, semi-ouverts, denses et les maquis para-forestiers sont les stades d'une succession secondaire suite à des feux répétés dans le passé. Les premiers stades de succession des maquis sont souvent caractérisés par une strate

arbustive, dont les espèces sont héliophiles, sempervirentes, souvent rabougries, à croissance lente, à feuilles vernissées et coriaces et d'une strate herbacée pouvant être dense, constituée principalement d'espèces de Cyperaceae à caractère pionnier (Jaffré 1980 ; Jaffré et al. 1998). Les espèces du genre *Costularia* constituent les plantes cibles de ce travail de thèse, et notamment *Costularia comosa*, espèce fréquente et à large répartition sur les massifs miniers de Nouvelle-Calédonie.

### 1.3.3. Les Cyperaceae pionnières des sols ultramafiques

Les plantes appartenant à la famille des Cyperaceae sont des angiospermes monocotylédones, cosmopolites, vivaces qui se rapprochent des graminées. Elles sont représentées par environ 5000 espèces (Bruhl 1995) dont 2000 appartenant au genre *Carex* (Reznicek 1990), ce qui en fait le genre le plus diversifié des plantes à fleurs. Écologiquement, les Cyperaceae sont très importantes, particulièrement parce qu'elles se développent sous toutes les latitudes, dans des environnements variés et souvent peu favorables comme les zones humides, sableuses ou métallifères.

En Nouvelle-Calédonie, les Cyperaceae sont les seules herbacées endémiques inféodées aux maquis miniers. Sur 33 espèces autochtones des milieux ultramafiques, 27 sont endémiques de la Nouvelle-Calédonie (Jaffré et al. 2001). Parmi ces 27 espèces, certaines sont dites pionnières des maquis, c'est-à-dire, qu'elles sont capables de s'implanter en premier sur un terrain nu et de donner naissance à un nouveau cycle écologique (Jaffré et Pelletier 1992). Ce sont ces espèces qui sont intéressantes dans le cadre de la revégétalisation et plus particulièrement celles appartenant aux quatre genres les plus répandus dont le caractère pionnier est très marqué : *Baumea*, *Lepidosperma*, *Schoenus* et *Costularia* qui nous intéresse plus spécialement. J. Raynal (1974) a décrit avec précision ce genre *Costularia*. Il distinguait alors 12 espèces endémiques à la Nouvelle-Calédonie, alors qu'A. Guillaumin (1938) n'en avait décrit que trois. Cet ouvrage est encore aujourd'hui une référence pour la description du genre *Costularia*.

Les Cyperaceae ont une grande capacité à fructifier et à se disséminer. La plupart d'entre elles se développent en groupe de talles appelées touffes (*Baumea*, *Costularia*, *Schoenus*...), on parle de croissance cespiteuse. Le diamètre de ces touffes s'étend de quelques dizaines de centimètres (*Schoenus neocaledonicus*) à plus de 1,5 m (*Costularia comosa*). Les feuilles des Cyperaceae sont généralement

basales et dépourvues de ligules, contrairement aux graminées. Les fleurs sont peu voyantes et sont pollinisées par le vent. À la différence des graminées, chaque fleur est protégée par une seule glume et non deux (Häfliger et Scholz 1982).

#### **1.3.4. Adaptation des plantes aux contraintes édaphiques des sols ultramafiques**

Les processus évolutifs et adaptatifs déployés par les organismes biologiques ont permis de développer des stratégies afin de résister, de croître, d'interagir et de se reproduire dans ces environnements ultramafiques fortement contraignants et hostiles. Les mécanismes adaptatifs qui permettent aux plantes de tolérer les sols avec des quantités réduites de Ca, des fortes concentrations de Mg et de métaux lourds, ne sont pas encore bien connus (Kazakou et al. 2008 ; Brady et al. 2005). On notera que la concentration en Mg et Ni dans les feuilles de plantes poussant sur des sols ultramafiques est significativement supérieure à celle des plantes sur sols non ultramafiques (Lee et al. 1977). À l'inverse, la concentration en Ca des feuilles est inférieure sur sol ultramafique. Les études de Rajakaruna (2004) suggèrent que les bases de la physiologie pour la tolérance aux sols serpentiniques peuvent impliquer un ou plusieurs mécanismes dont la discrimination dans l'assimilation des ions au niveau des racines, ou bien encore des systèmes de translocation et de chélation des ions dans les différents compartiments de la plante et de la cellule. Ainsi à l'intérieur de la cellule végétale, les métaux sont chélatés par des molécules organiques et l'excès est séquestré dans la vacuole (Perrier 2005). À l'intérieur du xylème, les métaux sont présents sous forme d'ions hydratés ou de complexes organo-métalliques. La réduction de la toxicité métallique peut également provenir de la colonisation de la plante par des champignons mycorhiziens, permettant par des sécrétions d'oxalates de bloquer les ions métalliques dans les sols (Fomina et al. 2005), ou permettant de fixer des métaux dans les parois et membranes cellulaires du champignon (Franco et al. 2004).

## **2. Nutrition des plantes et dynamique de l'azote et du phosphore dans le système sol-plante**

### **2.1. Généralités sur la nutrition des plantes**

La nutrition végétale est l'ensemble des processus qui permettent aux végétaux d'acquérir dans le milieu ambiant et d'assimiler les éléments nutritifs nécessaires à leurs différentes fonctions physiologiques : croissance, développement, reproduction. Dans le cas des végétaux vasculaires, elle se fait dans la solution du sol, c'est-à-dire l'eau et les sels minéraux, par les racines ou dans l'air par les feuilles (Mengel et al. 2001). Toutefois la solution du sol contient des éléments minéraux qui ne sont pas nécessairement utiles à la plante. Ainsi pour répondre aux besoins de la plante, l'absorption doit être sélective en accumulant et discriminant certains éléments dans des proportions différentielles (Mengel et al. 2001). Le processus d'absorption constitue une étape clef dans la nutrition végétale. L'absorption et le transport dépendent tout d'abord du diamètre et de la charge électrique des solutés (la valence des ions) : ce sont les molécules les moins chargées et les plus petites qui seront le plus facilement absorbées et transportées. L'absorption a lieu au niveau des racines fines, puis les nutriments se dirigent vers les vaisseaux conducteurs (Marshner 1995).

Les principaux éléments constitutifs de la matière organique sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote. Ces quatre éléments représentent plus de 90 % en moyenne de la matière sèche végétale. Les autres éléments sont nombreux et indispensables bien que ne dépassant pas globalement les 3% de la matière sèche. Les éléments appelés majeurs ou macronutriments (azote, phosphore, potassium, magnésium, calcium, soufre et sodium) jouent un rôle structural (constituant des structures organiques), catalytique (activateur d'enzymes) ou régulateur (osmorégulation) dans l'organisation fonctionnelle de la plante. Les oligo-éléments ou micronutriments jouent principalement un rôle de catalyseur dans le métabolisme et interviennent à très petite dose (fer, zinc, cuivre, manganèse, molybdène, nickel et bore...). Le défaut de certains de ces éléments peut être à l'origine des maladies de carence (Marschner 1995).

Le pH de la solution du sol est un élément déterminant pour une bonne dissolution des éléments nutritifs et surtout pour une absorption efficace de ces

éléments nutritifs par les plantes, car il permet d'harmoniser les échanges électriques entre les racines et l'environnement dans lequel elles se développent (Hinsinger et al. 2003). Le pH n'est pas stable dans le temps, les lessivages acidifient les sols, alors que le complexe argilo-humique, lui, est un excellent stabilisateur de pH. La plupart des plantes ont un optimum de croissance pour un pH entre 6 et 7,5 permettant l'absorption des cations et des anions de la solution du sol par l'intermédiaire des poils absorbants des racines (Marschner 1995). Les racines interviennent dans les changements de pH de la rhizosphère, ces changements influencent la biodisponibilité de nutriments et d'éléments métalliques, et par conséquent ils influent également sur la physiologie des racines et des microorganismes de la rhizosphère (Hinsinger et al. 2003, 2008).

Dans les sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie, les principaux nutriments de la croissance des plantes (azote et phosphore) sont en quantité limitante et sont soit adsorbés aux particules du sol (phosphate) (L'huillier et al. 1998 ; Dubus et Becquer 2001), soit lessivés par les pluies (nitrate) (Duwig et al. 2000). Dans ces conditions les plantes ont développé des adaptations pour subvenir à leurs besoins : recyclage des nutriments des parties sénescentes vers les organes juvéniles (Masclaux et al. 2001), excrétion de substances organiques par les racines pour libérer le phosphate complexé dans le sol (Shane et al. 2008), et symbioses avec des partenaires mycorhiziens ou bactériens (Lambers et al. 2008, 2009 ; Richardson et al. 2009). Ainsi la disponibilité des nutriments n'est pas seulement due à leur forme chimique dans le sol, mais également à la capacité des plantes à les mobiliser et à réguler leur assimilation.

## **2.2. Biodisponibilité et dynamique du P dans le système sol-plante**

Le phosphore est un des nutriments les moins mobiles (2-3 mm dans le sol) et les moins disponibles pour les plantes du fait de sa réactivité élevée avec de nombreux constituants du sol. En effet, les interactions électrostatiques des formes ioniques du phosphore avec les particules du sol et leur séquestration à la surface des argiles contribuent à rendre cet élément limitant pour la croissance de la plante (Giroux et Enright 2002). De plus, les sols ferrallitiques ferritiques possèdent une concentration en phosphore en solution généralement très faible (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ).

Le cycle du phosphore est restreint au sol de surface, à la couche de litière et aux organismes qui vivent dans ces horizons. On le trouve dans le sol soit sous



forme *inorganique* (principalement de phosphate :  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), soit sous forme *organique*, principalement dans l'acide phytique, les acides nucléiques et les phospholipides. Trois principaux processus chimiques déterminent la biodisponibilité du phosphore inorganique dans le sol :

- *La spéciation* : selon le pH de la solution du sol, l'élément P peut être présent sous quatre formes chimiques, mais les plus courantes et assimilables sont  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Ces anions forment souvent des complexes avec des cations métalliques.
- *La précipitation-dissolution* : en solution neutre ou alcaline, les ions phosphates précipitent avec le calcium et en solution acide ils précipitent plutôt avec le fer et l'aluminium.
- *L'adsorption-désorption* des ions phosphates dans les minéraux du sol : le P du sol est sous forme d'anion, il est donc susceptible de s'adsorber sur des entités chargées positivement comportant des groupes type hydroxyle, carboxyle ou silanol, comme les oxydes métalliques (particulièrement présents dans les sols tropicaux). La désorption s'effectue par échange de ligand, par exemple avec du citrate ou du bicarbonate (ce dernier provenant de l'exsudation des racines et des microorganismes du sol).

La biodisponibilité du P inorganique est donc affectée par les variations de pH de la rhizosphère. Il a été montré que la quantité de phosphates acquise et accumulée par la plante augmente linéairement avec la diminution du pH dans la rhizosphère (Hinsinger 2001). Les racines sont responsables de changements considérables du pH de la rhizosphère par plusieurs mécanismes, dont le principal semble être l'excrétion d'ions  $\text{H}^+$  ou  $\text{OH}^-/\text{HCO}_3^-$  qui contrebalance l'entrée de cations ou d'anions. Les racines sécrètent également des exudats composés de sucres et d'acides organiques (Neuman et Römheld 1999), en quantité et en composition très variables, mais leur contribution aux variations de pH reste controversée (Hinsinger 2001). En général, la quantité d'acides et d'anions organiques excrétés augmente lorsque le stress en P augmente, mais très peu de références sont disponibles sur ce sujet (Hinsinger et al. 2003). Il a été montré sur le lupin blanc que la sécrétion de citrate, augmentant considérablement la concentration en P dans la solution du sol, joue un rôle important dans l'acquisition du P et du Fe par la plante (Shane et al. 2008). Mais il faut pour cela un taux de sécrétion de citrate très élevé (10-50  $\mu\text{mol/g}$  sol). Cependant, sur le riz, Kirk et al. (1999) ont montré une augmentation de la biodisponibilité en P pour des taux de sécrétion plus faibles. Il a mis en évidence que

dans ce cas les principaux mécanismes de libération du P sont : (i) la chélation des métaux précipitant avec les ions P, (ii) la formation d'un complexe soluble citrate-métal-phosphate.

Quoi qu'il en soit, il est difficile de prévoir en quelle mesure et en quel sens la biodisponibilité du P va répondre à un changement de pH, mais il est certain que ce facteur a une très grande importance (Hinsinger et al. 2003, 2008). De même le rôle des exudations de molécules organiques est sujet à controverse. Ces acides et anions organiques une fois relâchés dans la rhizosphère s'adsorbent sur des constituants du sol entre autres sur des oxydes métalliques de la même façon que les ions P mais avec une affinité moindre. Cette adsorption conduit malgré tout à la désorption d'une partie des ions P par une réaction d'échange de ligands, et contribue à l'augmentation de la biodisponibilité du P dans le sol. Ce mécanisme se limite à l'interface sol-racine car les acides et anions organiques sont rapidement adsorbés et diffusent peu dans le sol (Hinsinger 2001). Sur les sols très pauvres en phosphore soluble, le développement de racines renflées (racine "cluster") permet aux plantes qui les possèdent, un meilleur accès aux phosphates par l'intermédiaire d'une plus grande surface d'échange entre la racine et le sol (Lambers et al. 2006).

### 2.3. Biodisponibilité et dynamique de l'azote dans le système sol-plante

L'azote nécessaire à la croissance, à l'activité photosynthétique et à la reproduction des végétaux est un élément essentiel de la structure des protéines. Les besoins en azote de la plante peuvent être résolus par deux mécanismes distincts : l'**acquisition de l'azote du sol** (Mengel et al. 2001) et la **réallocation de l'azote** d'un compartiment vers un autre (Ganzert et Pfadenhauer 1986 ; Malagoli et al. 2005). Les bactéries du sol sont des acteurs principaux du cycle de l'azote dans les écosystèmes naturels. Ce sont elles qui permettent l'entrée de l'azote dans le système (fixation de l'azote atmosphérique), ainsi que sa transformation (nitrification) et sa sortie (dénitrification). Ces réactions métaboliques bactériennes font intervenir des enzymes présentes dans le génome de certaines bactéries. La **fixation de l'azote atmosphérique** ( $N_2$ ), réalisée par les bactéries possédant la nitrogénase (*Azobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*...), fournit la principale source d'azote dans les écosystèmes naturels. La **dénitrification** est un processus bactérien de respiration alternatif qui s'opère sous l'action de bactéries spécifiques, satisfaisant

leur besoin en oxygène par une désoxygénation des ions nitrates sous l'effet des enzymes nitrate réductase. Le processus de dénitrification consiste en plusieurs étapes au cours desquelles les nitrates sont réduits en azote gazeux.

Dans le sol, l'azote est présent sous différentes formes chimiques : des formes minérales, comme les ions nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), et des formes organiques telles que les acides aminés provenant de la décomposition de la matière organique. L'azote organique n'est pas directement **assimilable par les racines**. Sa minéralisation par la microflore et la microfaune du sol fournit la majorité de l'azote disponible pour la croissance des plantes. Les plantes sont généralement capables d'absorber l'azote sous forme d'ion  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  (Richardson et al. 2009). Cependant certaines Cypéracées arctiques sont capables de l'absorber sous forme organique (acides aminés) dans des conditions climatiques où la minéralisation est très lente (Chapin et al. 1993). L'azote minéral est en quantité faible dans le sol (50 à 200 kg/ha) avec des fluctuations importantes en fonction de la minéralisation de la matière organique et du lessivage. Les nitrates sont faiblement retenus par le complexe argilo-humique, ils sont très mobiles et vont rapidement être lessivés par les eaux de pluies, particulièrement dans les sols drainant et sous des climats comportant des épisodes pluvieux violents comme cela est le cas en Nouvelle-Calédonie (Duwig et al. 2000). En revanche les ions  $\text{NH}_4^+$  ont une faible mobilité dans le sol. L'ammonium est une source importante d'azote pour la plante. Il est assimilé par les cellules de la plante via des transporteurs d'ammonium dans les membranes plasmiques et distribué aux différents compartiments intracellulaires. L'ammonium n'est généralement pas utilisé pour les transports à longue distance de l'azote dans la plante (Howitt et Udvardi 2000). Dans le phloème, l'azote est principalement véhiculé sous forme de nitrate ou d'acide aminé. Plusieurs systèmes de transports permettent l'acquisition de l'azote du sol sous forme d'ion nitrate par les racines de la plante: (i) par des systèmes à forte affinité (HATS) fonctionnant à de faibles concentrations en nitrate dans le sol ( $C < 500 \mu\text{M}$ ) et (ii) par des systèmes non saturables à faible affinité (LATS) fonctionnant à de fortes concentrations en nitrate dans le sol ( $C > 1 \text{ mM}$ ). Ces deux systèmes de transport actif présentent deux composantes, l'une dont le mode d'action des gènes est constitutif, l'autre induite par une faible concentration en azote (Vedele et al. 1998 ; Forde 2000).

À l'échelle de la plante, la majeure partie de l'azote utilisé dans les différents compartiments provient de la "**réallocation**" de cet élément. Ainsi au fil du cycle

végétatif un compartiment peut être successivement un puits et une source d'azote. Par exemple, la stratégie de réallocation d'azote depuis les feuilles ombragées vers les feuilles éclairées permet d'augmenter de 15 à 20 % le gain photosynthétique de la plante (Malagoli 2004). Cette réallocation est déclenchée par une diminution de la concentration foliaire en sucres et fait intervenir des gènes, inductibles par le manque de lumière, qui déclenchent la sénescence en provoquant l'hydrolyse des protéines et la dégradation de la chlorophylle. Les composés azotés libérés transitent alors par le phloème vers les feuilles éclairées. On observe des mécanismes de remobilisation de composés azotés lors de la transition entre phase végétative et phase reproductive, l'azote est alors transféré depuis les organes végétatifs comme la tige, les feuilles et les racines principales vers les organes reproducteurs (Malagoli 2004 ; Imsande et Touraine 1994).

## **2.4. Adaptation spécifique de l'acquisition du phosphore par les Cyperaceae : Rôle des racines "cluster"**

### **2.4.1. Les racines "cluster"**

Le terme de racines "cluster" désigne différents types de structures racinaires fortement ramifiées (Shane et al. 2006), caractérisées par des renflements latéraux sur les racines principales (Lambers et al. 2006 ; Lamont 1993, 2003) (Fig. 4). La présence de ces structures racinaires spécifiques est connue chez deux familles de monocotylédones, Cyperaceae et Restoniaceae, et chez huit familles de dycotylédones, Proteaceae, Fabaceae, Casuarinaceae, Betulaceae, Myricaceae, Elaeagnaceae, Moraceae, Cucurbitaceae (Lambers et al. 2006). Les structures les mieux connues sont les racines protéoïdes développées par toutes les Proteaceae et certaines Fabaceae, il s'agit de zones localisées sur les racines principales sur lesquelles se développent de très nombreuses radicelles (Shane et al. 2008).



**Figure 4.** Morphologie de racines "cluster" induites par de faible teneur en phosphate. À gauche, racines protéoïdes de *Banksia sp.* d'Australie (échelle 13 mm), à droite racines dauciformes de *Tetraria sp.* d'Afrique du Sud (échelle 4mm) (d'après Lambers et al. 2006)

Certaines espèces de Cyperaceae développent un autre type de structure appelé les racines dauciformes. La présence de ces racines renflées en forme de carotte (dauciforme) a largement été observée chez certaines espèces de Cyperaceae d'Europe (Davies et al. 1973) et d'Australie (Lamont 1974). Il s'agit dans ce cas de zones localisées développant une très forte densité de poils racinaires, et non de radicelles (Shane et al. 2006). Ce type de racine est structurellement distinct mais fonctionnellement analogue aux racines "cluster" protéoïdes des Proteaceae (Shane et al. 2006). Plusieurs espèces de Cyperaceae sont capables de développer ces racines dauciformes dans des habitats variés (Lamont 1982 ; Miller et al. 1999 ; Miller 2005). Une déficience des sols en phosphore apparaît primordiale pour le développement des racines dauciformes (Playsted et al. 2006). La présence de telles structures n'a pas encore été étudiée sur les Cyperaceae néo-calédoniennes.

#### 2.4.2. Développement des racines "cluster"

Ces différentes structures racinaires en "cluster" citées précédemment ont en réalité un fonctionnement très similaire (Shane et al. 2006), elles confèrent à la racine une très grande surface d'échange qui permet une mobilisation active des nutriments et une acquisition efficace de certains de ces nutriments dans des sols

appauvris (Lamont 2003). Ces structures spécialisées se déplacent spatialement au fur et à mesure de la croissance de la racine, un "cluster" peut être actif quelques semaines, puis il y a sénescence (Lamont 2003 ; Shane et al. 2005).

La formation des racines "cluster" est induite par la privation de P dans le milieu et semble être régulée par la concentration interne en P et plus particulièrement dans les parties aériennes de la plante, et non par la concentration en P du sol (Neumann et al. 2000 ; Neumann et Martinoia 2002). Les mécanismes d'initiation sont mal connus, on suppose qu'il existe un contrôle génétique qui peut subir des modifications systémiques (Shane et al. 2005 ; Lambers et al. 2006). Il existe vraisemblablement des messagers à longue distance, comme l'auxine, qui sont transportés par la sève phloémique, en effet l'application d'auxine sur les racines (sans "cluster") en condition de bonne nutrition phosphatée supprime l'inhibition de la mise en place des racines "cluster" (Lamont 2003 ; Shane et al. 2005).

### 2.4.3. Les mécanismes de mobilisation du phosphore

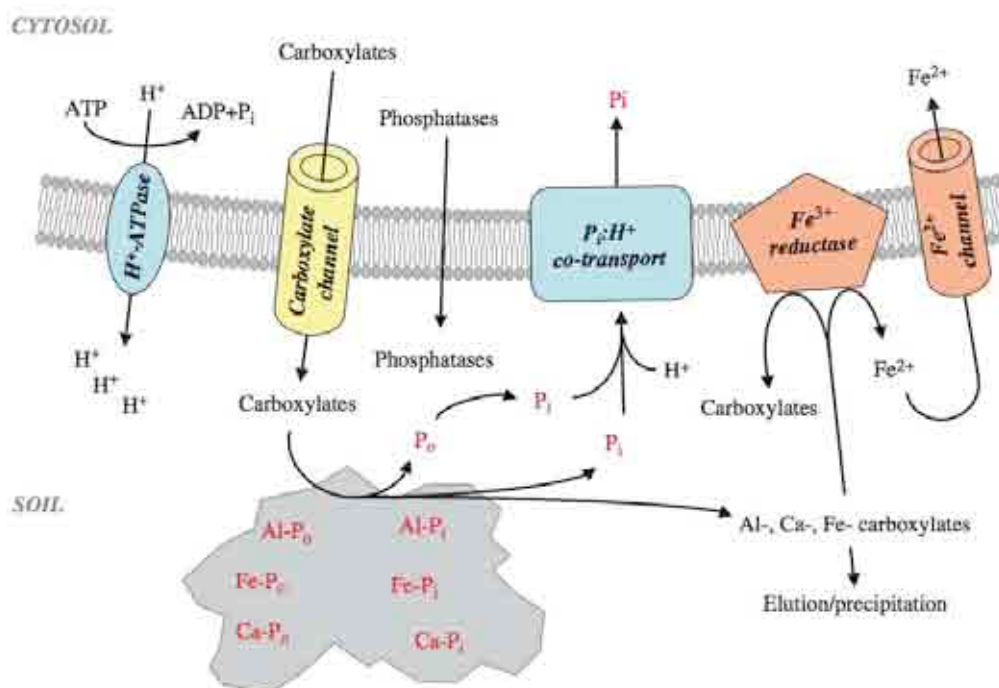
Il existe deux moyens d'augmenter l'acquisition du phosphore ; augmenter la surface d'acquisition et augmenter le taux de phosphore atteignant la surface de la racine. Cette combinaison de stratégies permet aux espèces développant des racines "cluster" d'acquérir plus de P dans des sols pauvres que des espèces n'en développant pas, parfois jusqu'à 10 fois plus (Lambers et al. 2006). Trois caractéristiques majeures des racines "cluster" déterminent l'efficacité d'acquisition du phosphore : la morphologie, l'exsudation et le métabolisme.

**La morphologie** : par leur morphologie, les racines "cluster" explorent jusqu'à 25 à 30 fois plus de volume de sol que des racines "non-cluster" (140 fois plus en tenant compte des poils racinaires), ce qui est essentiel pour l'acquisition d'éléments très peu mobiles comme le phosphore (Fig. 4). Par ailleurs, il a été montré que les espèces développant des racines "cluster" mobilisent davantage le phosphore présent dans la fraction non labile du sol (Lambers et al. 2006). En effet, du fait de la grande surface de racine développée pour un petit volume de sol, les exsudats racinaires solubilisant les nutriments sont davantage concentrés.

**L'exsudation** : les carboxylates exudés par les racines permettent la mobilisation du phosphore inorganique lié aux particules du sol, car ces carboxylates se complexent avec les cations métalliques rentrant en compétition avec les phosphates, ou encore parce qu'ils prennent la place du phosphate de la matrice du

sol par échange de ligand. Comme les racines "cluster" possèdent une grande surface, l'exudation racinaire des carboxylates est plus importante. Dans des conditions de stress en phosphore, le taux d'exudation de carboxylates dans la rhizosphère est donc beaucoup plus élevé et est en moyenne deux fois plus rapide chez les espèces à racines "cluster" que pour des racines non spécialisées. Les carboxylates exudés en forte concentration à proximité des racines et la diffusion du phosphate solubilisé consécutive à cette exudation permettent une absorption encore plus efficace du P (Fig. 5). Les racines sont capables d'adapter la nature des composés exudés à la composition chimique du sol présent. La nature des exudats dépend de la forme chimique sous laquelle se trouve le P du sol. Il semble que les tri-carboxylates soient plus efficaces que les mono et les di car ils ont plus d'affinité pour les métaux divalents ou trivalents et déplacent plus efficacement le phosphate des surfaces chargées (Shane et al 2008).

**Le métabolisme :** l'exudation de carboxylates augmente en réponse à un déficit en phosphore, tandis que certaines réactions métaboliques, nécessitant le phosphore comme substrat, ralentissent. Les carboxylates exudés résultent souvent du cycle de Krebs ou de ces dérivés (Fig.5).



**Figure 5.** Effet des carboxylates sur la mobilisation du phosphore inorganique et organique dans les sols. Les carboxylates sont relâchés par des canaux ioniques. Les phosphatases hydrolysent les P organiques qui sont mobilisés par les carboxylates (d'après Lambers et al. 2006)

L'enzyme cytosolique PEPcarboxylase est une enzyme-clef dans le mécanisme d'exudation du citrate, son rôle est de réalimenter le cycle de Krebs en intermédiaires carbonés, remplaçant ceux consommés pour l'exudation. Il a été montré que 25 à 35% du carbone fixé par la PEPcarboxylase est exudé en citrate et malate (Shane et al. 2005). De plus une augmentation de l'exudation du citrate coïncide avec une activité élevée de la PEPcarboxylase, une expression plus importante d'ARNm codant pour la PEPcarboxylase et par suite une plus grande abondance de PEPcarboxylase (Shane et al. 2005). Il existe ainsi une réelle spécialisation métabolique des racines "cluster" ; lors de la maturation de ces racines les enzymes du métabolisme du carbone sont davantage actives. Une fois que la racine est mature, on observe un pic d'exudation des carboxylates accumulés, et l'activité des enzymes liées au métabolisme du carbone baisse juste après le pic. La concentration en carboxylates dans la rhizosphère est multipliée par dix au moment du pic d'exudation, avant une chute rapide de celle-ci (Shane et al. 2005 ; Playsted et al. 2006).

### **3. Rôle des microorganismes rhizosphériques dans l'adaptation des plantes aux contraintes édaphiques**

Dans les conditions extrêmes des sols ultramafiques (Brooks 1987 ; Quantin et al. 1997), la présence des microorganismes de la rhizosphère joue un rôle essentiel par leur considérable contribution à la fertilité des sols, à la nutrition végétale et par leur rôle dans la tolérance aux métaux (Abbott et Murphy 2003 ; Lambers et al. 2009 ; Marschner 1995). La rhizosphère est la zone du sol directement influencée par les racines et les microorganismes associés. C'est le lieu d'échanges entre le végétal (exudation racinaire), le substrat (eau et minéraux) et les microorganismes du sol (nutrition azotée, phosphatée et carbonée...) (Dighton 2001 ; Marschner 1995). Parmi ces derniers, les bactéries et les champignons mycorhiziens sont une composante importante de la biosphère.

#### **3.1. Rôle des mycorhizes**

##### **3.1.1. Généralités**

Il y a plus de 465 millions d'années, les premiers végétaux vasculaires et champignons mycorhiziens s'associaient, les uns capables d'utiliser l'énergie solaire



pour se développer, les autres passés maîtres dans l'art d'absorber les composants nutritifs du sol. La complémentarité de rôle et de fonction de ces organismes aurait permis l'apparition au cours du temps de toute la diversité des plantes vasculaires terrestres (Brundrett 2002 ; Koide et Dickie 2002). Ce n'est que depuis quelques décennies que les botanistes et les mycologues ont remarqué que plus de 80% des plantes dans le monde développent des associations symbiotiques avec au moins un type de mycorhizes (Wang et Qiu 2006 ; Fitter and Moyersoen 1996). Cette symbiose se retrouve sous tous les climats, dans tous les écosystèmes et ce, indépendamment du type de sol, de végétation ou des conditions de croissance (Wang et Qiu 2006).

La symbiose mycorhizienne est une association mutualiste jouant un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à leur environnement. Les éléments du sol, le champignon symbiotique et la plante constituent ce que l'on peut appeler le système "minéral-champignon-plante" (Lambers et al. 2009). Le contact étroit créé entre les racines de la plante et le champignon par le biais du réseau filamenteux constitue le siège d'échanges nutritifs permettant la survie et le développement du champignon tout en améliorant la croissance de la plante hôte (Marschner et Dell 1994). En effet, le champignon, opérant comme une extension naturelle du système d'enracinement de la plante, est largement dispersé dans le sol grâce à un important réseau de filaments mycéliens extra-radiculaires. Il a ainsi accès à un volume de sol beaucoup plus important que le système racinaire de la plante. La longueur racinaire souvent relativement faible d'une plante et son diamètre relativement gros réduisent sa capacité de prélèvement des principaux éléments minéraux limitant sa croissance (phosphore et azote). En revanche, les hyphes des champignons ont un diamètre beaucoup plus fin (quelques  $\mu\text{m}$ ), ils peuvent devenir très longs et contiennent peu de cloisons transversales. Ils servent ainsi de pompe pour diriger vers la racine un supplément d'eau et de sels minéraux auxquels celle-ci n'aurait pas normalement accès. En contrepartie, les plantes alimentent leurs partenaires fongiques hétérotrophes en carbone issus de la photosynthèse, essentiels à leur croissance (sucre, acides aminés, vitamines). Elles leur attribuent ainsi une part importante de photo-assimilats, en général entre 25 et 30% des molécules carbonées qu'elles synthétisent (Smith et Read 1997). Le réseau mycélien contribue également à augmenter la disponibilité et la mobilité des éléments nutritifs présents en quantités limitantes dans la rhizosphère, et ce, en accélérant l'altération des minéraux (Arvieu

et al. 2003 ; Griffiths et al. 1999). Il en résulte une meilleure assimilation des nutriments : en premier lieu celle du P, et les taux de N, Mg, Ca, K, S, Zn, Cu, B peuvent être multipliés par deux ou trois lorsque la plante est mycorhizée (Jones et al. 2004 ; Hodge 2000 ; Marschner et Dell 1994 ; Smith et Read 2008 ).

Cette association peut également protéger la plante des organismes pathogènes (Azcon et Barea 1997 ; Selosse et al. 2004). Le symbiote fongique réduit le développement des maladies racinaires chez la plante hôte par sa faculté à produire des substances antibiotiques et par l'obstacle, assuré par le mycélium, très difficile à franchir par les micro-organismes pathogènes. Il a été également montré que la symbiose mycorhizienne peut augmenter la défense de la plante vis-à-vis de différents stress édaphiques, comme la toxicité métallique (Schützendübel et Polle 2002 ; Leyval et al. 1997), la déficience en eau (Augé 2001), le faible pH et la température élevée du sol (Smith et Read 2008).

### **3.1.2. Cyperaceae et mycorhizes sur sol ultramafique**

Les plantes de la famille des Cyperaceae ont pendant longtemps été considérées comme non mycorhizées (Powell 1975 ; Tester et al. 1987 ; Nadarajah et Nawawi 1988) ou faiblement mycorhizées (Wang et Qiu 2006). Cependant plusieurs auteurs décrivent des structures mycorhiziennes arbusculaires associés aux racines de Cyperaceae (Lamont 1982 ; Meney et al. 1993 ; Lovera et Cuenca 1996 ; Muthukumar et al. 1996 ; Miller et al. 1999 ; Harrington et Mitchell 2002 ; Gai et al. 2006 ; Perrier et al. 2006a) indiquant que le potentiel mycorhizien de cette famille est plus complexe et doit être reconsidéré.

Ces auteurs supposent que la présence des endomycorhizes au sein des racines de Cyperaceae est plutôt induite par des traits écologiques que supportée par des caractères de phylogénie. Par exemple, les Cyperaceae d'écosystèmes humides ne sont généralement pas mycorhizées alors que celles des milieux appauvris en nutriments, comme les sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie, semblent généralement être dépendantes des mycorhizes (Muthukumar et al. 2004). Ainsi, à partir de l'observation de la mycorhization de 26 espèces du genre *Carex*, Miller et al. (1999) suggèrent que le potentiel mycorhizien des Cyperaceae est lié à l'écologie, mais aussi à l'origine phylogénétique de l'espèce. Perrier et al. (2006a) décrivent des structures endomycorhiziennes au sein des racines de plusieurs

espèces de Cyperaceae inféodées au maquis minier, sans en démontrer le rôle sur la plante.

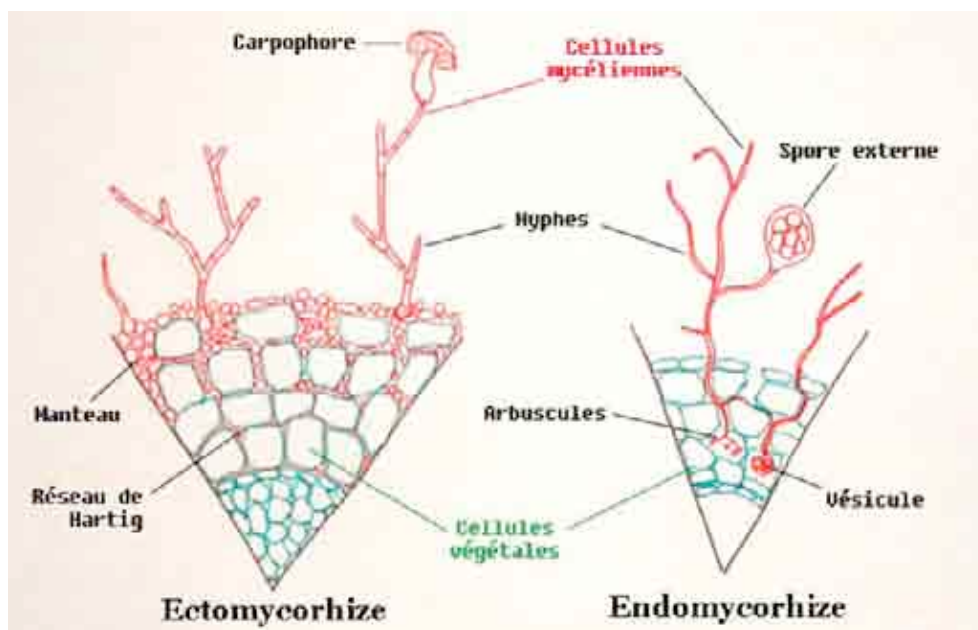
Le degré avec lequel les champignons mycorhiziens arbusculaires (Arbuscular Mycorrhizal Fungus : AMF) augmentent l'acquisition de nutriments pour la plante est connu pour être proportionnel au taux de colonisation des racines par les structures des AMF. La plupart des structures mycorhiziennes arbusculaires observées chez les Cyperaceae sont des hyphes intra-corticaux (à l'intérieur du cortex de la racine) et des vésicules de type *Glomus* (à l'intérieur des cellules du cortex) (Meney et al. 1993 ; Muthukumar et al. 2004 ; Perrier et al. 2006a). Ces structures, avec des taux de colonisation très bas par rapport à d'autres familles de plantes (Wang et Qiu 2006), ne sont pas suffisantes pour envisager le fonctionnement d'une association mutualiste entre les Cyperaceae et les mycorhizes arbusculaires sans travaux complémentaires. Aucune étude complète ne porte sur l'intensité de cette mycorhization et son effet sur la croissance des Cyperaceae. La question essentielle qui reste non résolue est de savoir comment cette faible colonisation mycorhizienne interfère avec la croissance et la survie des espèces de Cyperaceae.

### 3.1.3. Classification simplifiée des champignons mycorhizien

On regroupe actuellement les champignons dans le règne Eumycota (Eumycète) contenant cinq classes : les Chytridiomycètes, Zygomycètes, Gloméromycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes (Schüssler et al. 2001). L'essentiel des espèces connues a été décrit durant les deux dernières décennies, ce qui indique l'intérêt actuel pour ces organismes et la nécessité d'utiliser des outils modernes, notamment moléculaires pour leur traitement taxonomique. Cependant, les structures fongiques formées par les associations mycorhiziennes ont permis une classification sur la base de critères écologiques, morphologiques et physiologiques. On distingue trois classes principales : les ectomycorhizes, les endomycorhizes à arbuscules et les ectendomycorhizes. Ajoutons les mycorhizes de quelques familles de plantes présentant des particularités comme les mycorhizes arbutoïdes, les mycorhizes monotroïdes et les mycorhizes orchidoïdes.

Les **endomycorhizes arbusculaires** sont caractérisées par une structure typique, prenant l'apparence d'un arbuste microscopique. Au contact de la cellule racinaire, l'hyphe forme un appressorium. Le mycélium pénètre dans les cellules racinaires, il franchit les parois et repousse le plasmalemmes des cellules hôtes sans

le traverser (Fig. 6). Les hyphes passent ensuite de cellule à cellule et progressent dans les méats. Dans les cellules corticales de la racine, le champignon développe alors l'organe spécialisé en forme d'arbuscule, lieu d'échange entre les deux organismes. Grâce à ces structures singulières très ramifiées, les arbuscules permettent d'accroître considérablement la surface de contact entre le champignon et la plante, augmentant de fait les échanges de nutriments entre les symbiotes. Ces structures sont développées par toutes les espèces symbiotiques de la classe des Gloméromycètes. D'autres organes, les vésicules, ne sont présents que chez 4 des 7 genres décrits que comptent les AMF (Fig. 7). Comme les arbuscules, les vésicules sont localisées à l'intérieur des cellules corticales, mais on les retrouve également intercalées entre celles-ci. De formes variables, elles renferment en abondance des lipides et de nombreux noyaux. Il est suggéré que les vésicules sont d'importants organes de réserve.

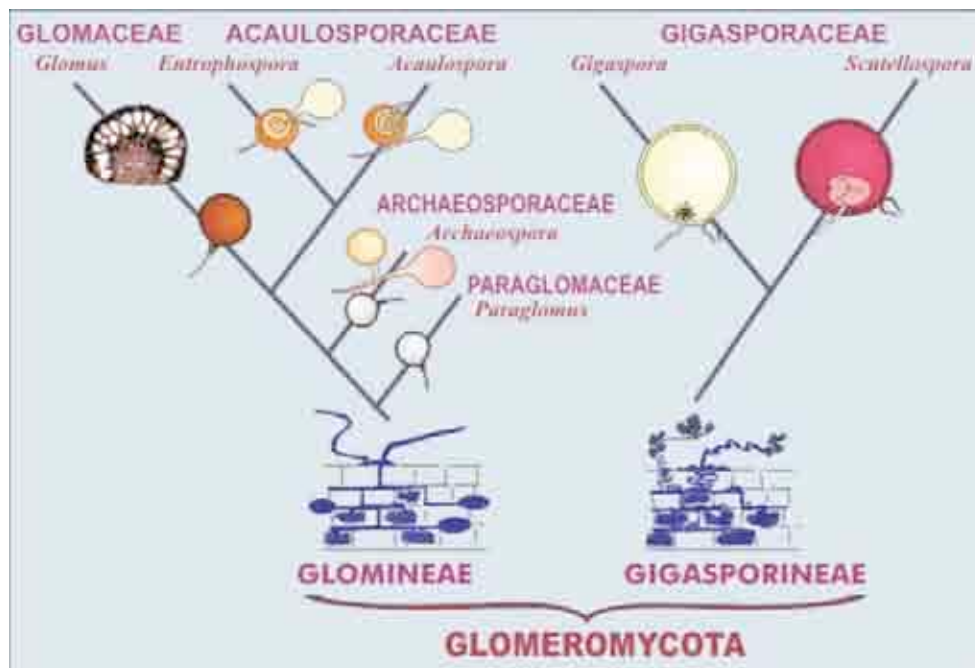


**Figure 6.** Schéma représentant deux coupes transversales de racine montrant les types principaux de colonisation des racines par les champignons mycorhiziens

Les AMF concernent essentiellement les plantes herbacées (95 %) mais elles sont capables de s'associer à des familles d'Angiospermes ligneux, de Gymnospermes, de Fougères, de Lycopodes et de Bryophytes. Ce sont des espèces à large spectre d'hôtes. Des spores sont observées dans le sol et dans les racines, elles servent d'organes de réserve et de propagation. Ce sont des structures cœnocytiqes (unicellulaires), de forme généralement sphérique et de taille variant

de 30 à 800  $\mu\text{m}$  de diamètre, elles possèdent une paroi épaisse formée d'une ou de plusieurs couches de différentes textures, reliées au réseau filamenteux par un hyphe suspenseur de morphologie variée. Ces caractères peuvent être influencés par différents facteurs comme le degré de maturité de la spore et les conditions du milieu. L'étude de l'ontogénèse de la paroi de la spore (les stades de formation de la spore jusqu'à sa germination) est utilisée comme structure de référence pour l'identification des espèces. Ainsi, en absence de spores, il n'est pas possible d'identifier l'espèce à partir de la structure de son hyphe mycélien au niveau du cortex racinaire, où plusieurs espèces peuvent coexister. Le séquençage partiel de l'ADN du champignon et la comparaison des séquences obtenues peuvent être utilisés pour caractériser l'endosymbiote.

L'ensemble des Gloméromycètes compte actuellement plus de 160 espèces distribuées en 7 genres : *Acaulospora*, *Archeospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Paraglomus* et *Scutellospora* (Fig. 7). L'essentiel des espèces connues appartient aux genres *Glomus*, *Acaulospora* et *Scutellospora*. Dans les sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie, *Glomus* dont les spores sont hyalines, blanches à jaune foncé et de petites tailles (90  $\mu\text{m}$  en moyenne) et *Acaulospora* dont les spores sont orange clair à orange foncé et de grandes tailles (295  $\mu\text{m}$  en moyenne) apparaissent être les genres dominants (Amir et al. unpublished).



**Figure 7.** Schéma représentant la classification simplifiée des 7 genres de Gloméromycète. Il représente les différences faites sur l'ontogénèse des spores et sur la présence de vésicules dans les cellules corticales (<http://invam.caf.wvu.edu>)

Les **ectomycorhizes** sont caractérisées par la présence d'un manteau fongique autour de la racine, elles concernent les principales espèces ligneuses des forêts boréales, tempérées, méditerranéenne et certaines forêts tropicales du globe. Ces champignons appartiennent principalement aux classes des Ascomycètes (ex : truffes) et des Basidiomycètes (ex : agarics, amanites, chanterelles, cortinaires). Le mycélium se développe entre les cellules du rhizoderme, mais ne pénètre pas dans les cellules vivantes, formant ainsi "le réseau intercellulaire de Hartig" (Fig. 6). Les ectomycorhizes jouent un rôle majeur dans l'acquisition des nutriments sous forme inorganique de la solution du sol, mais aussi dans la mobilisation des formes organiques du phosphore par sécrétion de phosphatases acides extracellulaires qui les hydrolysent et libèrent du P sous forme inorganique (Smith et Read 2008).

Les **ectendomycorhizes** sont des associations intermédiaires entre les deux précédentes : manteau externe avec des hyphes mycéliens qui pénètrent à l'intérieur des cellules racinaires. Elles concernent essentiellement les Ericaceae et les Pyrolaceae.

#### **3.1.4. Rôle des AMF dans l'acquisition du phosphore**

Les AMF confèrent un bénéfice nutritionnel à leur plante hôte par l'assimilation de macronutriments, d'éléments traces et d'eau qu'ils transfèrent du sol vers la plante (Pearson et Jakobsen 1993 ; Smith et Read 2008). La capacité de l'AMF à fournir du phosphore à la plante varie suivant l'affinité de l'AMF et de l'hôte. La colonisation contrôlée des racines par un inoculum contenant les mycorhizes sous forme de propagules augmente l'acquisition du P par la plante et le degré de modification dépend de la quantité initiale de P dans le sol et également de la quantité et de la forme de l'inoculum (Abbott et al. 1995). Les mycéliums permettent de récupérer les formes libres du P (scavenging), mais ne libèrent pas celles qui sont liées aux particules du sol (mining) (Lambers et al. 2008). Le prélèvement de phosphore par les racines peut être plus rapide que sa diffusion dans le sol, il s'installe alors une zone d'épuisement autour de la rhizosphère. Toute augmentation de la surface racinaire, en particulier par l'intermédiaire des hyphes mycorhiziens associés, permettra d'augmenter le volume du sol exploré et donc de surmonter la lenteur de la diffusion du P dans le sol : les nutriments absorbés par le mycélium sont transportés sur d'assez grandes distances (plus de 25 cm). Le processus du transfert du P

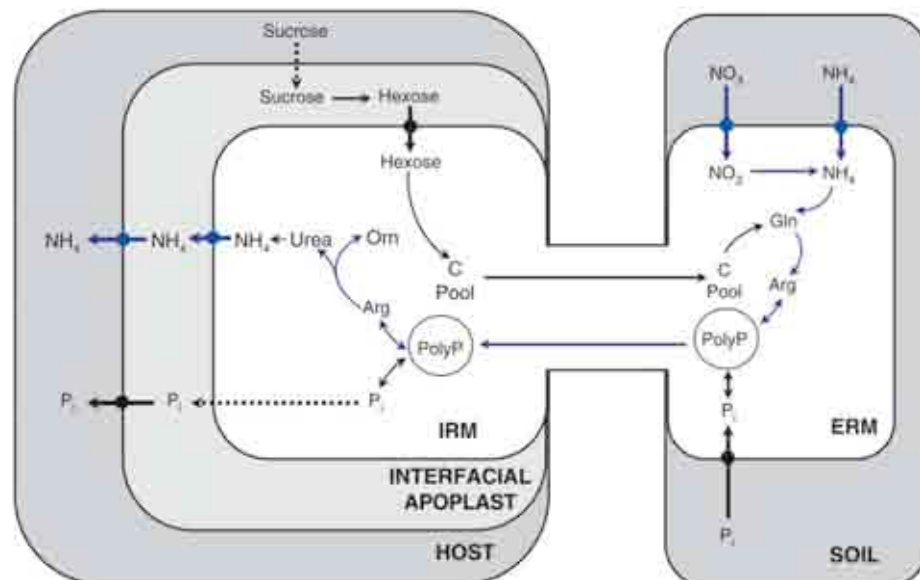
depuis le champignon jusqu'à la plante hôte est largement admis (Ezawa et al. 2002 ; Smith et Read 2008). Le phosphate présent dans la solution du sol est absorbé dans le mycélium extra-racinaire par des transporteurs (Harrison 1996). Les systèmes d'acquisition du phosphore situés à la surface des hyphes sont semblables à ceux des racines, il s'agit d'un système à forte affinité (Schachtman et al. 1998). Le phosphate ainsi absorbé est condensé en poly-phosphate (poly-P) et acheminé par translocation jusqu'au mycélium intra-racinaire. Les poly-P seront hydrolysés afin de libérer les phosphates qui traverseront la membrane du champignon, au niveau des arbuscules présent dans les cellules du cortex racinaire (Fig. 8). Il semble également que le champignon stocke le P et le transfère progressivement vers la plante car on observe une accumulation de poly-phosphates dans le champignon sans augmentation de la teneur en phosphate des vacuoles de la plante hôte. Le champignon serait donc capable de contrôler l'efflux de P vers la plante hôte (Solaiman et Saito 2001).

Il semble aussi que la plante soit capable de réguler son état mycorhizien selon la quantité de P biodisponible, lorsque le coût d'entretien des mycorhizes dépasse le bénéfice procuré par le champignon (Marshner 1995). Cela expliquerait le faible taux de mycorhization observé chez les plantes cultivées sur milieu riche en P. En effet, lorsque le phosphore soluble est présent en assez forte quantité, même si l'AMF induit toujours son accumulation dans la plante, il n'aurait plus d'influence sur la croissance (Al-Karaki 2002). Cependant, dans les sols où les concentrations en phosphore sont extrêmement faibles, de petits amendements peuvent influencer positivement la colonisation fongique. Ainsi, la teneur en phosphate du sol aurait des effets variés sur la symbiose mycorhizienne et sur l'AMF lui-même. La réduction de la colonisation du champignon résulterait d'une concentration en phosphore disponible trop élevée, ou au contraire trop faible. De plus, la présence d'une source de phosphore induirait une baisse générale de l'absorption des micronutriments, Fe, Mn, Cu... Cette baisse serait partiellement compensée lorsque la plante est mycorhizée (Alloush et al. 2000 ; Marschner 1995).

### **3.1.5. Rôle des AMF dans l'acquisition du N**

L'azote est également un élément important de la croissance des plantes. Son assimilation par les racines dans les sols pauvres en nutriment peut être augmentée par la colonisation des AMF (Marschner et Dell 1994 ; Johansen et al. 1996 ; Smith

et Read 2008). Les hyphes extra-racinaires des AMF sont capables de prélever et d'assimiler l'ammonium (Johansen et al. 1993, 1996), le nitrate (Bago et al. 1996 ; Johansen et al. 1996) et les acides aminés (Hawkins et al. 2000 ; Hodge et al. 2001) des sols qui les entourent. Ils sont également capables de transférer cet azote, provenant de différentes sources, vers la plante (Hawkins et al. 2000) et apparemment de le transférer d'une plante à une autre (He et al. 2003). Les AMF peuvent également augmenter la disponibilité des différentes formes d'azote pour la plante (Hodge et al. 2001). L'assimilation de l'ammonium semble cependant être la principale source d'azote absorbé par les AMF. Cet ion ammonium étant bien moins mobile que le nitrate dans le sol, ce type de mycorhize favorise les plantes hôtes dans des milieux où l'azote assimilable est principalement présent sous forme d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Toussaint et al. 2004), comme dans les sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. L'azote est ensuite incorporé aux acides aminés *via* le cycle de la glutamine synthétase-glutamate synthase, enzymes dont l'activité a été mise en évidence dans les mycéliums extra-racinaires (Govindarajulu et al. 2005). Il se retrouve stocké sous forme d'arginine dans le mycélium extra-racinaire ; l'arginine est transférée au mycélium intra-racinaire et est dégradée en ammonium dans cette partie du mycélium. C'est l'ammonium qui est transféré à la plante (Jin et al. 2005) (Fig. 8).



**Figure 8.** Modèle du transport de l'azote et de son métabolisme dans le système symbiotique entre la racine et l'AMF. N inorganique est absorbé par le mycélium extraracinaire (ERM), puis transloqué le long de l'hyphe jusqu'au mycelium intraracinaire (IRM) sous forme de N incorporé à l'arginine.  $\text{NH}_4$



relâché par l'arginine passe à la plante (host) par les transporteurs d'ammonium (Pi : orthophosphate ; PolyP : polyphosphate) (D'après Jin et al. 2005)

À ce jour les mécanismes qui déclenchent le transfert des nutriments vers la plante et les facteurs qui les contrôlent n'ont encore fait l'objet que d'études fragmentaires. Les systèmes de transport seraient des systèmes de transports actifs usuels fonctionnant grâce à un gradient de protons. En effet, l'interface entre le champignon et la plante se révèle riche en  $H^+$ -ATPase (Gianinazzi et al. 2000 ; Harrison 2005).

La teneur en azote dans le sol, que ce soit sous la forme  $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$ , apparaît corrélée négativement avec le développement des mycorhizes,  $NO_3^-$  ayant un effet inhibiteur supérieur à  $NH_4^+$  (Reynolds et al. 2005). De même que l'AMF peut être affecté de façon négative par une teneur trop élevée en phosphore soluble dans le sol, l'excès d'azote nuit au développement de l'AMF. Ainsi la concentration en azote de même que celle du phosphore, par une régulation complexe, constituent des facteurs activateurs et inhibiteurs de la mycorhization.

### **3.1.6. Rôle des AMF dans la tolérance aux métaux**

La forte concentration en nickel des sols ultramafiques calédoniens semble être bien tolérée par les AMF qui se sont adaptés à sa présence (Perrier et al. 2006a ; Amir et al. 2008). Certains AMF participent à la tolérance des plantes vis à vis des effets toxiques des métaux (Jeffries et al. 2003), rendant possible leur développement sur des sols aux fortes teneurs en métaux. De fait, les AMF modifient en effet les entrées et sorties des métaux dans la plante, ils se comportent donc parfois comme une protection pour la plante face à des sols toxiques. À l'inverse, les AMF qui ne sont pas issus de sols contaminés verront leur colonisation freinée ou même arrêtée par de trop grandes teneurs en métaux. Quelques travaux traitent de ce rôle des associations mycorhiziennes dans la tolérance aux métaux lourds que ce soient les associations ectomycorhiziennes (Panaccione et al. 2001 ; Leyval et al. 1997 ; Van Tichelen et al. 2001) ou endomycorhiziennes arbusculaires (Turnau et al. 2001, Turnau et Mesjasz-Przybylowicz 2003). Toutefois, peu de travaux ont concerné les situations combinant à la fois une toxicité métallique élevée et un endémisme fort telles celle des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (Perrier et al. 2006b).

En présence de fortes teneurs en métaux dans le sol, l'effet de la mycorhization semble parfois paradoxal, mais souvent l'AMF va protéger la plante en freinant l'accumulation des métaux dans la plante (Turnau et al. 2006). Ainsi, bien que toutes les plantes qui se développent sur des sols contaminés accumulent des quantités importantes de métaux lourds dans leurs racines ( $> 10\,000$  ppm), cette accumulation est bien moins élevée dans les racines des plantes mycorhizées par des AMF adaptés à ce type de sol (Cuenca et al. 2001). En fait, selon la concentration en métaux de la solution du sol, et selon si l'AMF est issu de sols contaminés ou non, il n'aura pas la même influence sur les flux de métaux (nickel) dans la plante. Enfin, en conditions contrôlées, les AMF provenant de sols contaminés ou non augmentent l'absorption et la translocation vers la plante de l'élément trace métallique, mais cette augmentation apparaît plus élevée pour l'écotype provenant de sols contaminés (Toler et al. 2005 ; Jamal et al. 2002). En définitive, certains AMF semblent capables d'améliorer la tolérance et la résistance de la plante à de fortes teneurs en nickel, tout en garantissant une nutrition améliorée en éléments présents en quantité limitante (Jeffries et al. 2003 ; Amir et Lagrange 2008)

## **3.2. Les bactéries rhizosphériques**

### **3.2.1. Généralités sur les bactéries du sol**

Le sol est un écosystème dynamique, complexe et sensible aux perturbations. Il ne constitue pas un environnement stable et homogène. Il est important de prendre en compte son hétérogénéité physique, chimique et biologique qui fait de lui une mosaïque de microenvironnements (Marschner 1995). Les différents micro-habitats du sol constituent un remarquable réservoir de microorganismes, avec pour chacun des populations propres, en fonction des sources de carbone et d'énergie, du pH, de la température, de la teneur en eau, de la circulation de l'oxygène, de la compétition et de la prédation... (Grundmann 2004 ; Hinsinger et al. 2009 ; Ranjard et Richaume 2001).

Les bactéries sont les organismes vivant dans le sol les plus diversifiés et les plus abondants (Killham 1994). Les activités métaboliques accomplies dans le sol par les bactéries sont impliquées dans de nombreux cycles biogéochimiques (grands processus de transformation de la matière) des principaux éléments nutritifs des plantes et des matières organiques (Attiwill et Adams 1993 ; Falkowski et al. 2008 ;

Matsumoto et al. 2005). Les bactéries jouent donc un rôle écologique essentiel dans la fertilité, la formation et la régénération des sols, la santé et la productivité des plantes (Dey et al. 2004 ; Bashan et al. 2004). Grâce à leur présence dans la rhizosphère des plantes, elles sont capables de réduire ou d'augmenter la libération, le transfert et l'absorption de nutriments et de métaux, jouant ainsi un rôle-clef dans la protection et la croissance de certains végétaux (Vessey 2003). Elles permettent, entre autres, l'entrée de l'azote dans le système sol/plante par fixation de l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) et la transformation de l'azote organique en molécule utilisable pour les plantes (Rick et Stuart 2001). Elles participent également aux cycles du phosphore dans les sols et à la minéralisation de nombreuses molécules organiques (Kalbitz et al. 2000).

### **3.2.2. Les rhizobactéries**

La rhizosphère est définie comme l'interface entre la plante et le sol, interface active par la présence de bactéries (Smith et Read 1997). La densité des populations de bactéries est considérablement augmentée dans la rhizosphère et diminue au fur et à mesure que l'on s'écarte de la racine. En effet, l'exudation d'acides organiques, d'acides aminés ou de lipides par les racines (approximativement 2 mm autour de la racine) et la décomposition des matières organiques mortes (débris issus des cellules végétales mortes) modifient l'environnement rhizosphérique (Brimecombe et al. 2001). Il s'ensuit par conséquent une modification de la structure et de la composition des populations bactériennes au contact des racines (Kennedy 1999). En d'autres termes, la rhizodéposition influence largement le développement de la flore rhizobactérienne qui s'en nourrit, sélectionnant probablement des espèces physiologiquement bénéfiques pour la nutrition de la plante (Richardson et al. 2009).

### **3.2.3. Interactions fonctionnelles entre les rhizobactéries et la croissance des plantes**

Les rhizobactéries sont impliquées dans divers processus améliorant le développement des plantes. Entre autres, une petite proportion de ces rhizobactéries (2 à 5%) stimule la croissance des plantes (Autoun et Kloepper 2001). Elles sont qualifiées de Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (Kloepper et Schroth 1978). Pour promouvoir la croissance les PGPR utilisent un ou plusieurs **mécanismes d'action directs ou indirects**. Ces mécanismes peuvent avoir une

action simultanée ou différée à différentes étapes de la croissance de la plante. Pour qu'il y ait effet de la population bactérienne sur la croissance d'une plante, il faut qu'une interaction plante-bactérie se mette en place et qu'une colonisation des racines par la population bactérienne s'effectue. La prise en compte de la compatibilité plante-bactérie et de la compétitivité des bactéries entre elles, semble figurer les facteurs importants à l'expression de l'effet PGPR, sans pour autant exiger une spécificité de la souche à l'égard de la plante (Heulin et al. 1994). Cette compatibilité vient essentiellement de la nature des exsudats racinaires jouant un rôle dans la reconnaissance et l'attraction par chimiotactisme entre les bactéries et les tissus de la plante (Bashan et Holguin 1997 ; Liu et Sinclair 1993).

Les effets bénéfiques par des **mécanismes d'action directs** consistent en une stimulation de la croissance racinaire en relation avec la production de phytohormones par ces bactéries (symbiose associative entre la bactérie PGPR et sa plante hôte). Au vu des recherches dans ce domaine, L'AIA (acide indol-3-acétique : auxine) semble être l'hormone de croissance la plus importante dans l'interaction plante/bactérie (Barazani et Friedman 1999), sa synthèse par une majorité de bactéries de la rhizosphère aurait un rôle prépondérant dans la promotion de la croissance racinaire (Leinhos et Vacek 1994). L'intérêt de la production de l'AIA par les bactéries semble évident pour la plante, mais quel en est le bénéfice pour le microorganisme ? L'AIA est produit par les bactéries à partir du tryptophane, ce dernier, relargué par les protéines issues des cellules mortes et des exsudats racinaires est une molécule nuisible aux cellules bactériennes. La transformation du tryptophane en AIA est donc un moyen pour les bactéries de détoxifier l'environnement en éliminant le tryptophane (Lebuhn et al. 1997). Une autre hormone semble jouer un rôle important : l'éthylène. Cette substance, produite par les plantes, a la fonction de lever la dormance et de stimuler la germination (Glick et al. 1999). Mais elle doit être absente pendant le développement de la plante car elle inhibe la croissance des racines. Certaines espèces bactériennes sont capables d'hydrolyser l'éthylène grâce à l'enzyme ACC désaminase (aminocyclopropane-1-carboxylate désaminase) afin de supprimer son action inhibitrice du développement racinaire (Bashan et al. 2004). Des découvertes récentes montrent également l'implication des cytokinines (de Salamone et al. 2001) et des gibberellines (Vessey 2003) produites par les rhizobactéries dans la régulation de la croissance végétale (Osorio-Vega 2007).

Les **mécanismes d'action indirects** concernent la santé et à la nutrition de la plante. Ils peuvent améliorer significativement l'émergence, la vigueur et la production des plantes par le contrôle biologique des phytopathogènes (Compant et al. 2005) à travers la production d'antibiotique, d'enzymes de lyse, ou à travers la compétition pour les nutriments et l'espace (Autoun et Kloepper 2001). En effet, la présence des autres microorganismes peut engendrer des réactions d'association, d'antagonisme ou de compétition entre eux (Keel et Défago 1997). L'assimilation du phosphate, souvent fortement complexé aux particules du sol, peut être favorisée par la sécrétion bactérienne de molécules le solubilisant (Rodriguez et Fraga 1999). Ainsi, la sécrétion d'acides organiques provoque l'acidification du milieu et la libération du phosphate par échange de ligand sur les particules du sol (Hinsinger 2001 ; Richardson et al. 2009)). Un autre phénomène de solubilisation du phosphate par les bactéries est la minéralisation du phosphore organique, réalisée par l'action de quelques phosphatases pratiquant la déphosphorylation par hydrolyse des liaisons phospho-ester ou phospho-anhydride (Rossolini et al. 1998). Une hypothèse serait que les anions organiques pourraient avoir une propriété supplémentaire qui est la libération des molécules de phosphore organique du complexe du sol, les rendant ainsi accessibles à l'action des phosphatases (Rodriguez et Fraga 1999). Des bactéries libres solubilisant les phosphates sont toujours présentes dans les sols, leur nombre est plus important dans la rhizosphère que dans les sols non rhizosphériques (Richardson 2001). De nombreuses bactéries ont aussi développé une stratégie d'acquisition du fer basée sur la production et la sécrétion de sidérophores, composés extracellulaires de faible poids moléculaire, qui solubilisent et chélatent le fer pour le transporter à la surface des cellules (Neilands 1995). Des études ont démontré en outre que certaines plantes sont capables de détourner et d'utiliser des sidérophores bactériens dans leur processus d'acquisition du fer (Crowley et al. 1992 ; Burd et al. 2000).

Une grande partie des études du fonctionnement de l'association plante/bactérie PGPR concerne le genre *Azospirillum* (Bashan et al 2004). Les mécanismes d'action de l'amélioration de la croissance des plantes par *Azospirillum* semblent liés à plusieurs processus : fixation d'azote atmosphérique, production d'hormone (auxines, Gibbérellines, éthylène). Outre le genre *Azospirillum*, pour lequel de nombreuses études ont été effectuées (Bashan et al. 2004), d'autres bactéries rhizosphériques améliorent également la croissance de leur plante hôte (Dey et al.

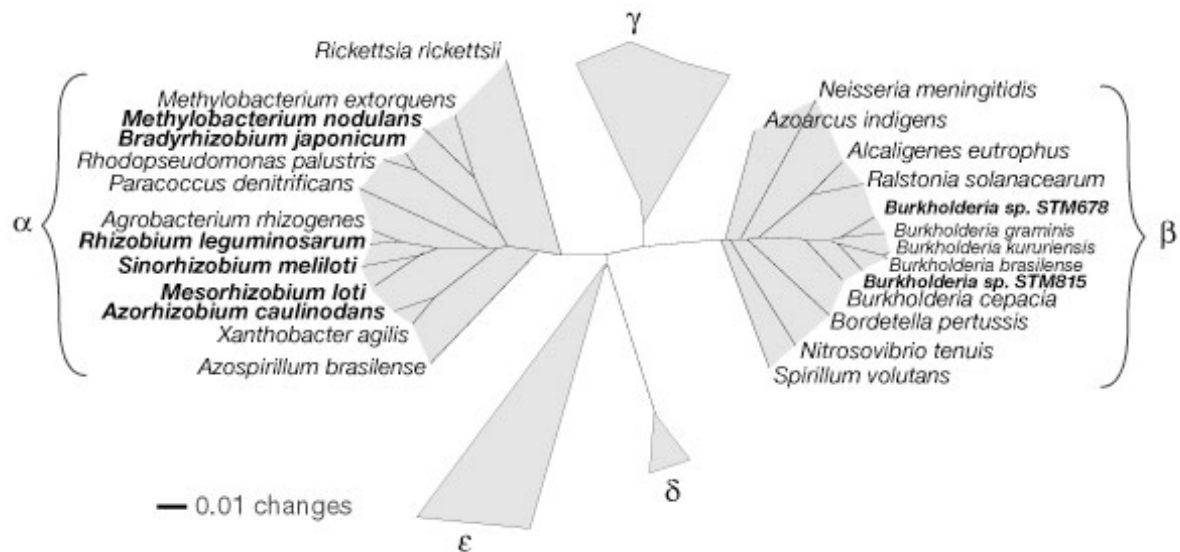
2004 ; Hameeda et al. 2008). L'orientation dominante actuelle des recherches est de tenter de découvrir d'autres genres et familles de microorganismes à effet PGPR important. Mercky (1998) a pour sa part recherché la présence du genre *Azospirillum* dans la rhizosphère de plusieurs Cyperaceae des maquis calédoniens, mais sans succès. Néanmoins, elle a isolé deux souches au niveau de ces rhizosphères avec des effets positifs sur la croissance d'une graminée (*Chloris gayana*).

Tous ces caractères PGPR, parfois présents chez les bactéries, illustrent la complexité et la difficulté d'associer la promotion de croissance des plantes avec une fonction particulière de la bactérie. Ils expliquent pourquoi de meilleures réponses sont souvent obtenues avec l'inoculation d'un mélange de PGPR. Dans le domaine appliqué, les effets PGPR offrent des possibilités intéressantes pour l'agronomie (diminution par exemple des intrants azotés polluants grâce à la phytostimulation), pour la restauration (introduction de microorganismes bénéfiques aux plantes) ou pour la santé des plantes (lutte biologique).

#### **3.2.4. Bactéries et rhizobactéries des sols ultramafiques**

La pauvreté en éléments nutritifs et la forte teneur en certains métaux des sols ultramafiques des maquis néo-calédoniens limitent l'activité microbienne. La densité microbienne y est 50 à 1000 fois plus faible que dans les sols agricoles de fertilité moyenne (Mercky 1998). Il semblerait cependant qu'une microflore, largement méconnue, se soit adaptée à ces conditions difficiles. Amid et Pineau (1998) ont présenté une vue générale de la microflore de quelques sols ultramafiques calédoniens et ont analysé l'influence des plantes elles-mêmes sur cette microflore. Ainsi, les rhizosphères de deux plantes pionnières, une ligneuse (*Grevillea gillivrayi*) et une herbacée (*Costularia comosa*) apparaissent avoir une forte influence sur la densité et la composition du cortège microbien. Le pourcentage des actinomycètes passe de 85 % dans les sols nus à 20 % dans les sols rhizosphériques, au bénéfice des bactéries. Cette différence de densité et de composition du cortège microbien, entre les deux types de substrats, est probablement due à la présence de composés facilement dégradables comme les exsudats racinaires pour lesquels les bactéries sont plus compétitives (Amir et Pineau 1998). Herrera et al. (2007) notent également la faible proportion de Proteobactéries dans les déblais, en particulier les alpha-Proteobactéries, connues pour être impliquées dans des fonctions essentielles du cycle des nutriments (Fig. 9). Ce groupe redevient majoritaire dès que la végétation

est installée (plantation ou végétation naturelle). Ce développement des Protéobactéries semble dû au carbone et à l'azote provenant de la plante (Hery et al. 2005a).



**Figure 9.** Relations phylogénétiques entre différents genres de bactéries de l'embranchement des Proteobactéries incluant les alpha, bêta, delta, gamma et epsilon qui représentent les différentes subdivisions des Proteobactéries. Les principaux genres de bactéries isolées dans les rhizosphères appartiennent aux groupes des alpha et bêta Proteobactéries, représentés sur cet arbre phylogénétique (d'après Moulin et al. 2001)

D'autres études ont été réalisées sur des plantes néo-calédonienne endémiques à caractère pionnier (*Serianthes calycina* et *Gymnostoma* sp.) formant des nodules avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote atmosphérique. Ces espèces, considérées comme des espèces fertilisant les sols en azote (Sarraiilh 2002 ; Jaffré et al. 1997), sont également des cibles privilégiées pour les travaux de restauration des sites miniers. En effet, la fixation d'azote atmosphérique représentant la principale source d'azote disponible dans ces sols, la présence de ces plantes pourrait stimuler de nombreux processus biologiques impliqués dans le cycle de l'azote et dans la fertilité des sols à revégétaliser. Des travaux, concernant les espèces bactériennes fixatrices du genre *Frankia* (Actinomycète), symbiotiques de la famille des Casuarinacées (Navarro et al. 1997 ; Jaffré et al. 2001b) et celles du genre *Bradyrhizobium* (alpha-Protéobactéries), symbiotique de *Serianthes calycina* de la famille des Fabacées (Chaintreuil et al. 2007), ont mis en évidence la résistance au nickel de ces souches fixatrices. Concernant la famille des Actinomycètes, de nouvelles espèces appartenant aux genres *Streptomyces*,

*Nocardia* et *Amycolatopsis* ont été décrites (Saintpierre et al. 2003, 2004, 2005) suggérant une forte spéciation des microorganismes, probablement provoquée par des processus adaptatifs liés aux fortes contraintes des sols ultramafiques (Mirete et al. 2007).

Ces dernières années, de nombreuses recherches ont porté leur attention sur les communautés bactériennes résistantes au nickel des sols ultramafiques en Italie (Mengoni et al. 2001), en Inde (Pal et al. 2004, 2007) et en Nouvelle-Calédonie (Amir et Pineau 2003 ; Hery et al. 2004 ; Stoppel et Schlegel 1995). D'autres études ont également porté sur la résistance au nickel des communautés associées aux racines des plantes endémiques, hyperaccumulatrices ou non, de ces milieux (Abou-Shanab et al. 2003 ; Chaintreuil et al. 2007 ; Idris et al. 2004 ; Mercky 1999 ; Pal et al. 2007).

### **3.2.5. Déterminisme de la résistance au nickel des bactéries**

Dans ces sols calédoniens, depuis des millions d'années, les bactéries sont naturellement en contact avec des fortes teneurs en métaux lourds. Parmi ces métaux, le nickel apparaît être l'élément le plus toxique pour les organismes telluriques, comparativement aux autres éléments métalliques présents dans les sols ultramafiques calédoniens (L'Huillier et Edighoffer 1996 ; Nagy et Proctor 1997). La toxicité du nickel cible de façon non spécifique les protéines, les acides nucléiques ou les polysaccharides en altérant leur conformation, ce qui a pour conséquence de rendre certaines enzymes inactives et réduire la viabilité de l'organisme (Hery 2004). La sensibilité au nickel des bactéries des sols est très variable, en fonction de leurs propriétés intrinsèques (groupe de déterminants génétiques de résistance qu'elles possèdent) et de leur localisation dans les micro-habitats du sol (bactéries plus ou moins exposées à la toxicité métallique). Outre la résistance au Ni, certaines bactéries des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie sont également résistantes au Co, Cu et du Zn (Stoppel et Schlegel 1995).

L'émergence des déterminants de résistance aux métaux lourds semble correspondre à un événement qui s'est produit très tôt dans l'évolution (Silver 1998 ; Silver et Phung 1996, 2005). Les déterminants génétiques de résistance aux métaux souvent localisés sur des plasmides (Liesegang et al. 1993), permettent par cette localisation plasmidique le transfert de ces déterminants d'une bactérie à une autre par conjugaison ou transduction (Harnett et Gyles 1984). Ainsi, le transfert latéral de



gènes semble avoir un rôle important dans la transmission et l'évolution des déterminants génétiques de résistance aux métaux lourds dans le sol (Coombs et Barkay 2004). En effet, les bactéries des sols calédoniens, naturellement en contact depuis des millions d'années avec de fortes teneurs en métaux toxiques, ont dû développer des adaptations spécifiques à long terme pour se protéger de son effet toxique. C'est d'ailleurs à partir des sols calédoniens que certaines bactéries très résistantes au nickel ont été isolées et que de nouveaux déterminants génétiques de résistance ont pu être mis en évidence (Schlegel et al. 1991 ; Stoppel et Schlegel 1995). Le principal procédé de régulation de la concentration en ions métalliques dans les cellules bactériennes repose sur le système d'efflux de cations métalliques, permettant leur exclusion rapide hors de la cellule bactérienne (Nies 1999 ; Silver 1996). Différents systèmes d'efflux du nickel chez les bactéries ont été déterminés comme étant liés à des protéines transmembranaires de la superfamille Résistance-Nodulation-Division (RND) (Nies 2003). Les systèmes les mieux connus sont basés sur les protéines *nreB* et *cnrT* codées par des opérons (groupement de gènes reliés à une même fonction) plasmidiques de plusieurs souches modèles de *Ralstonia metallidurans* isolées à partir des biotopes pollués riches en métaux lourds (Goris et al. 2001 ; Mergeay et al. 1985, 2003).

Ce travail tentera donc d'apporter des éléments de réponse sur les stratégies de nutrition minérale de ces espèces de *Costularia* et sur la façon d'optimiser leur croissance en milieu naturel et en milieu semi-contrôlé de manière à envisager un usage des Cyperaceae dans des itinéraires techniques de revégétalisation. Il sera crucial d'examiner les possibilités d'application dans le domaine de la restauration écologique des sites miniers, notamment par la réalisation de champs semenciers en soulignant les recommandations de mise en pratique. La finalité est d'aboutir à l'obtention de souches de mycorhizes et de bactéries permettant d'améliorer l'installation, la croissance et la survie des espèces préconisées pour la revégétalisation des sites dégradés. La recherche appliquée aura alors un rôle majeur à jouer dans la mise au point de techniques de mycorhization contrôlée et d'inoculation bactérienne intégrées aux itinéraires de revégétalisation par semi-hydraulique et plantation.





# **CHAPITRE 1.\* Phytosociology and soil chemistry relationships on an ultramafic weathering sequence in the South-west of New Caledonia**

Lagrange A.<sup>1, 2, 6</sup>, Rigault F.<sup>3</sup>, L'Huillier L.<sup>4</sup>, Derroire G.<sup>5</sup>, Ambrosi J.P.<sup>1</sup>

In memory of late Nicolas Perrier

<sup>1</sup>CEREGE, Aix-Marseille Université, CNRS, IRD, CdF, BP 80, 13545 Aix en Provence, France

<sup>2</sup>Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement, Université de la Nouvelle-Calédonie, BPR4, 98851 Nouméa Cedex, New Caledonia

<sup>3</sup>IRD, UMR AMAP, Laboratoire de Biologie et d'Ecologie végétale appliquées, BPA5, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

<sup>4</sup>Programme Sysmin, Institut Agronomique néo-Calédonien, BP 73, 98890 Païta Cedex, New Caledonia

<sup>5</sup>Programme Forêt, Institut Agronomique néo-Calédonien, BP 73, 98890 Païta Cedex, New Caledonia

<sup>6</sup>SIRAS Pacifique, Société Internationale de Réhabilitation et d'Aménagement des Sites, 16 rue Edouard Glasser, Motor Pool, 98800 Nouméa Cedex, New Caledonia

**Key words:** soil chemistry, ultramafic flora, edaphic influence, ecological diversity, New Caledonia, ecological restoration

\* article en préparation

## 1.1. Introduction

New Caledonia is formed of 5 500 km<sup>2</sup> ultramafic parent rock (one third of the total land area) rising from sea level up to 1618 m altitude (Jaffré et al. 1987; Proctor 2003). Exposed to tropical climate during several million years, these rocks have undergone an intense geochemical weathering, which has generated a lateritic mantle several tens of meters thick (Latham 1985). The current lateritic landscapes are therefore the result of the geochemical meltdown of ultramafic rock but also the dissection of the regolith mantle by mechanical erosion (Chevillotte et al. 2006; Latham 1985). These ultramafic soils are diversified but are enriched in heavy metals generally considered as potentially phyto-toxic (nickel, cobalt, manganese and chromium) and excessively poor in nutrients (P, K, Ca) (Brady et al. 2005; Brooks 1987).

The special features of these highly unfavourable soils to vegetation (Brooks 1987) have encouraged active speciation of several plant families (Eibl et al. 2001; Jaffré et al. 1987; Rajakaruna 2004). The outcome of this long process led to the development of endemic, rich and unusual biological ecosystems, making this island a biodiversity hot spot where conservation ought to be a priority (Jaffré 1992; Myers et al. 2000). However, the existing evaluations of this floristic diversity and the ecosystem organisation remain insufficient. Further studies need to be carried out.

The "maquis" (shrub dominated vegetation), which is the most common vegetation on New Caledonian ultramafic soils, involves various types and commonly forms boundaries with paraforest and forest types vegetation (Jaffré 1992; Morat et al. 1986). These boundaries are relatively abrupt (about 1 - 20m) with some species shared between vegetation types, but the species associations in each type remain often different (Jaffré 1980; Read et al. 2006). In situations where the climate is relatively favourable, the diversity between different sites (micro-endemism) and between different plant associations has been principally attributed to edaphic properties and their position in the landscape (Jaffré et Latham 1974; Robinson et al. 1997). These factors influence the present vegetation distribution in conjunction with the sequential development following natural disturbances (temporally based hypotheses, Connell and Lowman 1989; Hart 1990) or human activities such as fire and mining (Jaffré et al. 1998; McCoy et al. 1999).

Nickel and chromium mining, which started at the end of the 19th century, has degraded a part of the ecological patrimony of New Caledonia. Since the end of the 70's, scientists have been searching for methods to re-establish the vegetation cover, on degraded mining sites, to protect slopes from erosion, regulate the hydrologic cycle and to reconstruct the original biotope (Jaffré et al. 1994; Pelletier 2003). Ecological restoration implies a careful choice of species, on a case-by-case basis depending on the characteristics of the restoration sites (soils, topography, original vegetation). The success of ecological restoration depends on how the subsequent graduation towards more complex plant groups is managed including the re-used of the topsoil and the conservation of ecological corridors (Cooke and Johnson 2002; Li et al. 2005). The application of these methods could be partly achieved through better knowledge of the natural organisation and relationships between soil diversity and plant communities.

Thus, the purpose of the present work is to conduct investigations involving soil science, botany and ecology to characterise the vegetation phytosociology on a natural soil sequence from a small ultramafic catchment of New Caledonia in relation with the soil geochemistry. To test the hypothesis that soil conditions vary among these vegetation facies, we describe the diversity and composition of plant communities in relation with the main soil factors. A particular attention is carried on to the bulk soil chemistry, the nutrient contents, and the metals availabilities evaluated using conventional extraction methods. This study provides information to understand ecological environment organisation and therefore determines parameters linked to the location of the vegetation types. These data could be important to apply an adequate technique to reinitiate vegetation with endemic flora on the mines mucks or embankments according to ecological rehabilitation.

## **1.2. Site description**

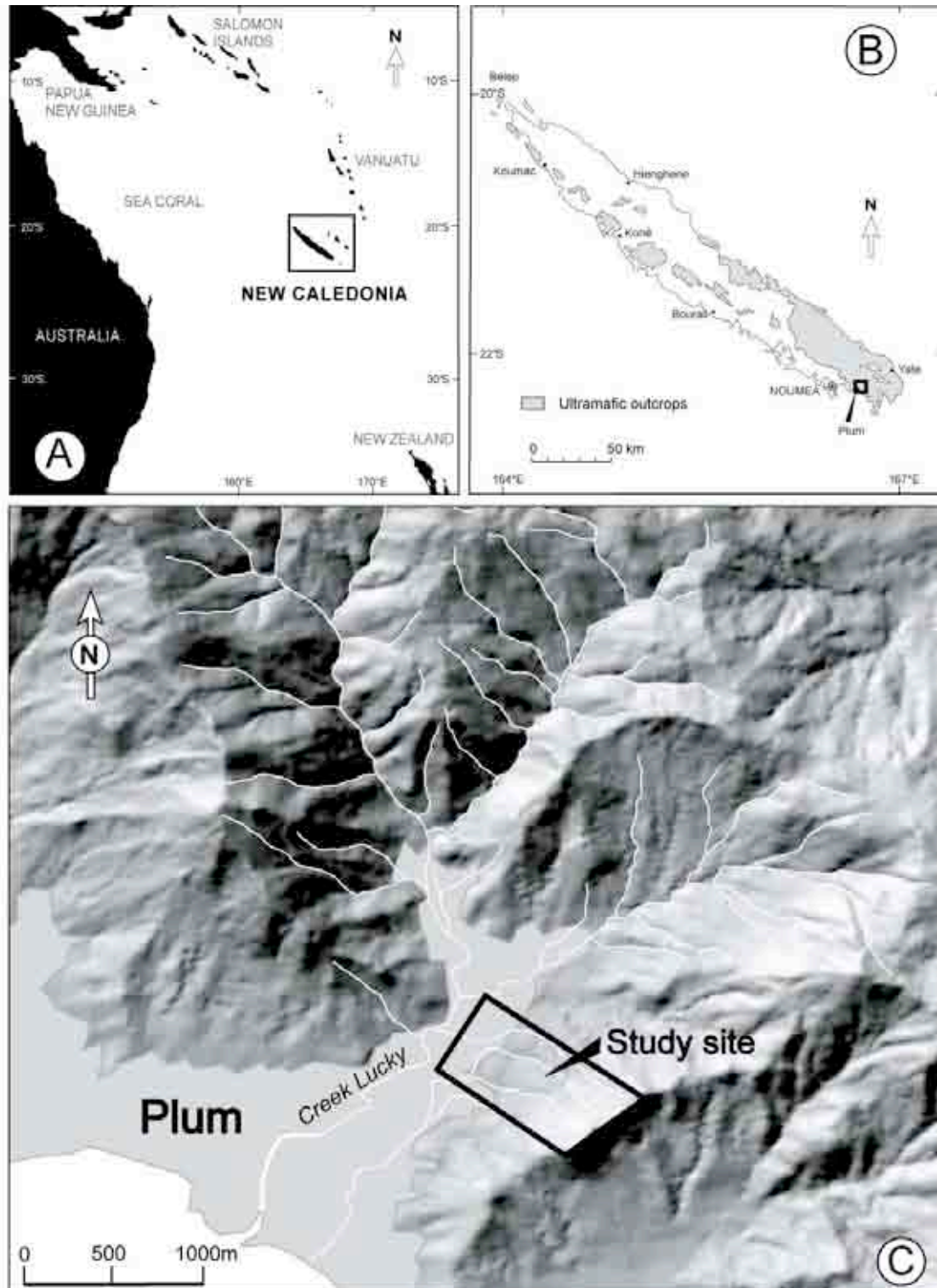
### **1.2.1. Situation and climate**

The New Caledonia archipelago is situated in the South Pacific, approximately 1500 km east of Australia and 1800 km north of New Zealand (Fig 1.1). The climate is subtropical to tropical, with a rainy season from December to May and a dry season from September to November that can vary in duration and severity. Mean monthly temperature in the capital, Noumea, is highest in February with 26.2°C and lowest in August with 19.9°C (Enright et al. 2001). Eighty percent of this ultramafic area is covered by maquis vegetation under annual rainfalls varying from 900 to 4000 mm (Proctor 2003; Read et al. 2006).

The study site is situated in the great south ultramafic massif. We have carried out an ecological study of the soil-plant relationships in a small catchment area in Plum zone at 22°16'E, 166°38'S (Fig 1.1). The study site's altitude varies from 34 to 206 m. The topography is rugged with slopes often above 30% and downslope. The annual rainfall on the study site ranges from 900 to 2000 mm with variations between and within years.

### **1.2.2. Vegetation and flora**

In our study site, the preliminary observations revealed several vegetation types where the boundaries are relatively abrupt and inside which the associations of species seem to vary. The vegetation is a mosaic of maquis and relict forests (paraforest formations). The paraforest formations are restricted to humid or topographically protected sites and form small patches surrounded by maquis. Caledonian maquis has more than 1100 species with an endemism level of 89 % (Morat et al. 1986) and occurs generally in old forest zones which have declined, during the last centuries, following successive fires (McCoy et al. 1999). There are several unifying features: maquis is evergreen, 1-7 m tall, more or less bushy or with a dense sedge layer, most species are sclerophyllous and it includes some transitional forest forms. Most of the maquis species have a well-developed superficial root system (Jaffré 1980).

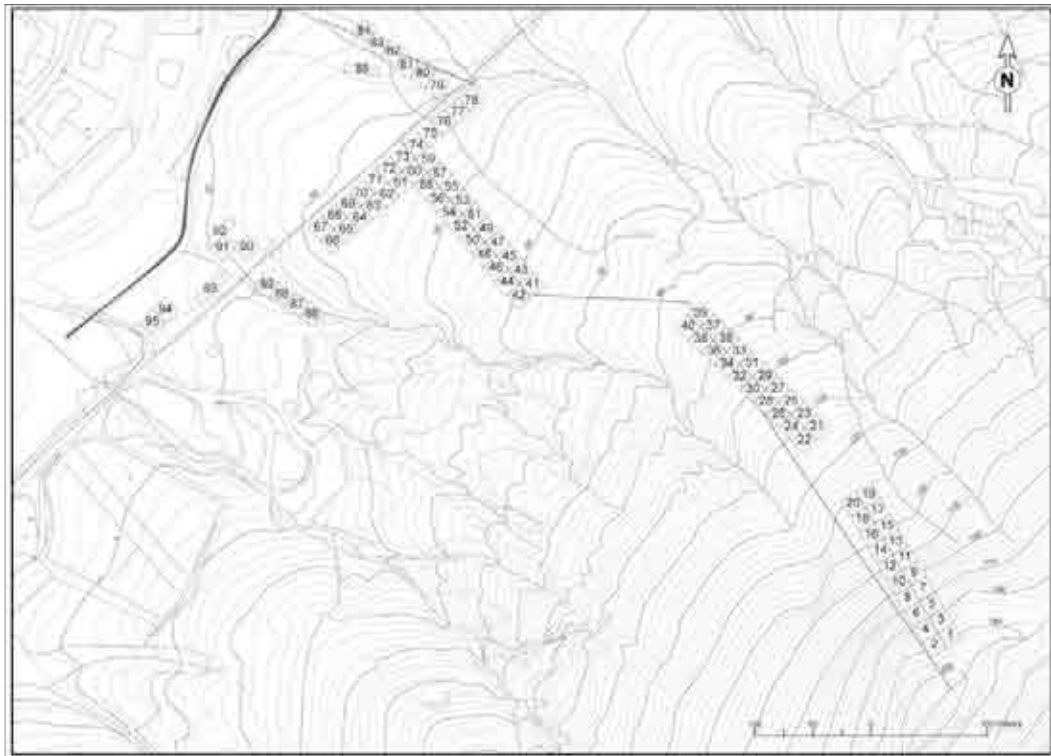


**Figure 1.1.** (A) Situation of the New Caledonia in the South East Pacific (B) Map of the ultramafic bodies of New Caledonia (in grey) with the study site location (C) Toposequence localised on the catchment area



### 1.2.3. Geology and soils

The sequence is situated on a slope of a small catchment (Fig 1.1 and 1.2). Slope action can lead to mixture of materials with intermediate soils resulting. The observation of the study site shows erosion processes on the top of the sequence and material accumulation on bottom slope (colluvial and alluvial inputs). This topographic gradient consists in: 1- Upper steep bedrock slope studded with large peridotite boulders (hazburgite) (from 130 to 200 m). Saprolitic soil between the boulders is rich in organic matter and fine roots. 2- Various incised bedrock slope with a very thin regolith (saprolite) resulting from the ultramafic bedrock weathering. It is covered by cobbles of bedrock and ferricrete (from 82 to 124 m). 3- A pediment is made of irregular colluvial lateritic material giving birth to ferritic soil (from 40 to 76 m). The downslope part of the pediment is rich in reworked goethitic pisolites coming from disaggregation of a former ferricrete. 4- Thalwegs of temporary streams filled with ferritic or saprolitic sediments coming from the upper zones of the sequence (part from 34 to 40 m).



**Figure 1.2.** Relief map of the topographic sequence situated on a south slope of small catchment downstream part of Lucky River with plot locations and numbering

## 1.3. Materials and methods

### 1.3.1. Vegetation mapping

The transect position was determined on the toposequence to have all edaphic and floristic conditions and to avoid transition zones. On this transect 95 plots (10 m x 10 m) were set up in representative areas of vegetation (Fig 1.2). The number of plots within each vegetation type was approximately proportional to their representation in the landscape. Our study included 58 plots in the maquis and 37 in paraforests associations. On each plot, species composition was quantified. The Braun-Blanquet cover classification was used to describe species presence and abundance in maquis and paraforest formations (Braun-Blanquet 1932; Kent and Coker 1992). Plant species were identified at the IRD herbarium - NOU (Noumea).

### 1.3.2. Soil sampling and chemical analysis

The soil samples were collected in each of the 95 plots (Fig 1.2). The samples included organic matter layer and surface litter and were studied at a depth of 0 to 18 cm. Soil was collected from the central point of each plot. The samples were air dried immediately after collection and sieved through a 2 mm mesh before analysis. Soil pH was measured in distilled water (1/2.5 soil solution m/v ratio).

Total C and N were measured using an automatic CHNOS analyser (Thermoquest Finnigan). Samples were also analysed for total concentrations of major and trace elements (P, K, Ca, Mg, Na, Ni, Fe, Al, Cr, Mn, Co, Zn, Si, Cu) after alkaline fusion of soil and measurement by ICP-OES (Optima 3300 DV, Perkin Elmer).

To assess the mobility of soil elements, an aqueous extraction (1/5 soil solution m/v ratio) was used to measure the concentration of elements (Mg, K, Na, Ca), pH and electric conductivity. This extraction belongs to soluble water elements.

Exchangeable cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) and total cationic exchange capacity (CEC) were measured using displacement with a 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution, the major cations were analysed by atomic absorption spectrometry. This extraction quantified the exchangeable elements.

Two successive KCl extractions (KCl 1 M solution in a 1/10 soil solution m/v ratio) were performed according to the Lindsay and Norvell (1978) method modified by Bourdon et al. (1997). Ni, Fe, Cr, Mn, Co, Mg, Na and Ca were measured in the KCl extract by ICP-OES. This extraction evaluates the elements easily displaced by ionic exchange.

Diethylenetriamino pentaacetic acid extractions (DTPA 0.005 M + CaCl<sub>2</sub> 0.01 M solution in a 1/5 soil solution m/v ratio) were used to assess metal availabilities for plants under the condition of root exudates. We measured the concentrations in extracts by ICP-OES for Ni, Fe, Cr, Mn, Co, Mg and Al. All analyses were performed at the Noumea IRD analysis laboratory (IMAGO, US 191), in accordance with standard methods.

### **1.3.3. Statistical treatment**

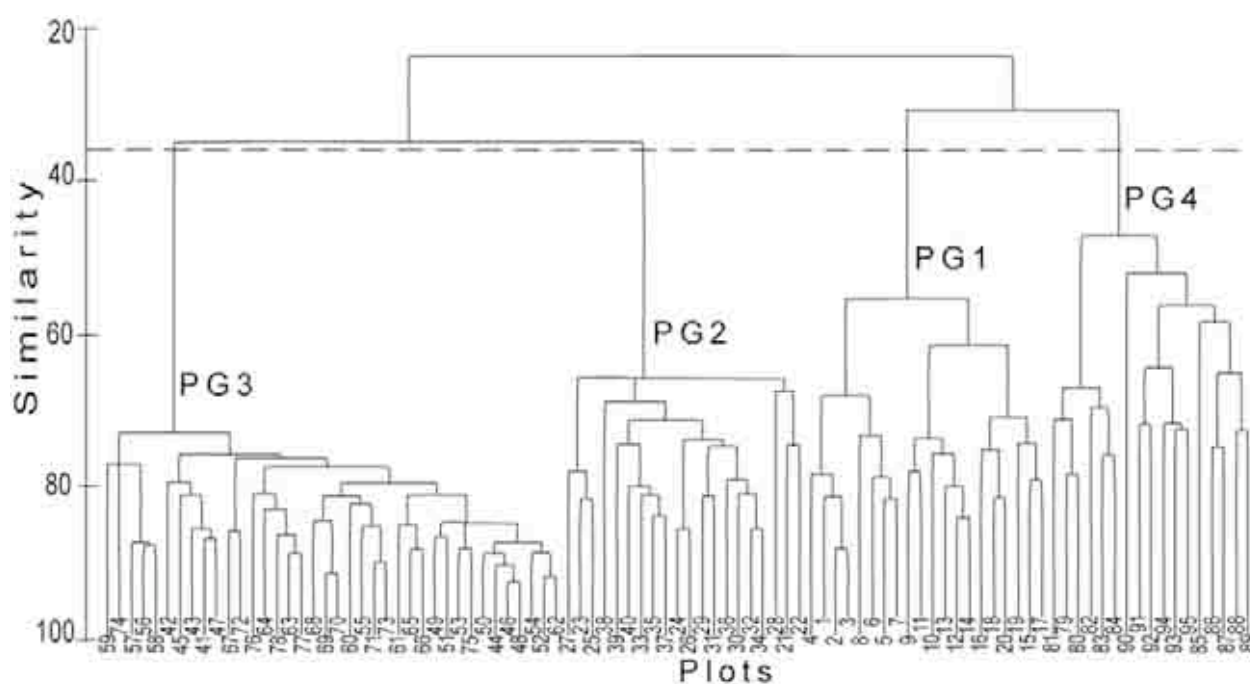
Vegetation plot data (cover-abundance scores) allow to generate a similarity matrix based on the Bray-Curtis measure similarity. This is useful to measure the similarity degree of a community composition. Data were further summarized using an agglomerative hierarchical cluster (AHC) analysis with the same matrix. Floristic plot were then ordered with Non-metric MultiDimensional Scaling (NMDS). NMDS was validated using an analysis of similarities (two-way-crossed ANOSIM) (Clarke 1993). Specific contribution of species for each group was executed by SIMPER. NMDS, ANOSIM and SIMPER were undertaken with PRIMER vs. 6 (Clarke and Warwick 1994).

Principal component analysis (PCA Xlstat 2008, Addinsoft) was used to relate total element composition of the soil to the plot of vegetation overlying the toposequence. All geochemical data were n-standardised and varimax rotation used. Agglomerative hierarchical clustering (AHC Xlstat 2008, Addinsoft) was used on data obtained from various extractions to make up homogeneous groups of objects (classes) on the basis of their description by a set of variables. We used Pearson correlation coefficient similarity. For each extraction, clustering indicates similarity between elements and group of plot.

## 1.4. Results

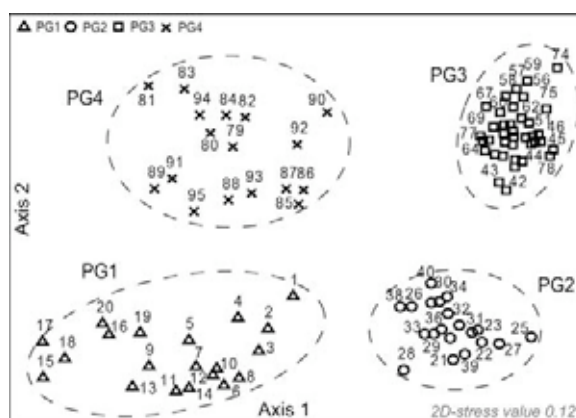
### 1.4.1. Phytosociology

Using agglomerative hierarchical cluster analysis, the dendrogram shows that the plots can be organised in four clusters with a similarity index of 36 % (Fig 1.3). Phytosociological group 1 (PG1) corresponds to plots situated at the top slope of the sequence, the second (PG2) is constituted of plots of the middle slope, the third (PG3) with those located at piedmont, and the fourth (PG4) with those at the bottom of the toposequence.



**Figure 1.3.** Dendrogram of the agglomerative hierarchical clustering performed on the phytosociology data of the sequence shows 4 phytosociological groups (PG1 to PG4) with a similarity index of 36%

The NMDS ordination of plant species composition of the 95 plots has a stress value of 0.12 (the lower the value, the better the plots ordination representation) (Fig 1.4). Graphic representation confirms clearly the same four distinct groups. Grouping is assessed by ANOSIM test, which showed significant differences in species composition among floristic groups (global  $R$ -value=0.993,  $P$ =0.001). Pairwise tests found significant differences between all pairs of four floristic groups, pairings of groups 1-2 ( $R$ =0.992), groups 1-4 ( $R$ =0.966), groups 2-4 ( $R$ =0.985), groups 3-4 ( $R$ =0.997) and groups 1-3 and 2-3 ( $R$ =1) indicating complete separation.



**Figure 1.4.** Two dimensional non-metric multidimensional scaling (NMDS) of the 95 floristic plots along the soil sequence

Cumulated specific contribution of each group, participate in 95% of the Bray Curtis similarity index, are calculated by SAMPER analysis (supplementary data: Table 1.1). Values explain percentage species contribution within each group whereas Similarity/standard deviation ratio (Si/SD) indicates the constancy of the species within the group plots.

### ***Phytosociological group 1 (PG1)***

This group is composed of 20 plots situated at the top of the sequence, on the steep slope formed with large peridotite boulders where fires seldom occur. Between these boulders, the litter escapes partially to the movement by the drainage; it creates humid zone with organic matter in the cavity where mesophile species become more abundant to form paraforest formation. Out of 65 inventoried species, 29 species account for 90% of the total contribution of this group (supplementary data 2). The superior stratum, which is 5 to 6 m high, includes in decreasing order of contribution: *Osmanthus austrocaledonicus*, *Austrobuxus carunculatus*, *Artroclianthus stipitacus*, *Homalium deplanchei*, *Lethedon tannensis*, *Beccariella crebifolia*, *Garcinia* sp. (cumulative contribution 17%). The shrubby stratum comprises mainly heliophitic shrubby species: *Soulamea pancheri*, *Eugenia gacognei*, *Hibbertia vieillardii*, *Casearia sylvana*, *Dodonaea viscosa*, *Ixora collina*, *Phyllanthus balanseanus*, *Styphelia pancheri*, *Stenocarpus milnei*, *Diospyros vieillardii*, *Eugenia stricta* (cumulative contribution 43%). The most abundant lianas are *Alyxia tisserantii*, *Capparis* sp. (cumulative contribution 7%). The herbaceous

stratum is mainly composed of one species of Cyperaceae that develops in patches: *Lepidosperma perteres* (contribution 4%). The constancy ratio is highest for *Casearia sylvana* (contribution 13,4%).

### **Phytosociological group 2 (PG2)**

PG2 includes 20 plots on the ligno-herbaceous maquis characterised by *Costularia* spp. association (tussocks cyperaceous) and located on eroded ferrallitic soils. This soil appears as a thin layer and scattered over more or less weathered blocks. This association of species possesses a well-developed herbaceous stratum with a covering of 70 % and a discontinuous woody stratum composed of many species regenerated from roots stocks and covering about 50 %. When bared, the soils have a sleek aspect due to superficial encrusting, caused by a quick drainage of rainwater. Forty-six species are counted and 20 of these account for 90% of the total contribution (supplementary data 2). The woody stratum that is generally below to 1.5 m high, is mainly composed of *Cloezia artensis*, *Sannantha leratii*, *Pancheria alaternoides*, *Scaevola beckii*, *Hibbertia vieillardii*, *Peripterygia marginata*, *Grevillea gillivrayi*, *Scaevola montana* which participate for 48% of the PG2 total contribution. Herbaceous stratum is composed of *Costularia arundinacea*, *Lepidosperma perteres*, *Baumea deplanchei*, *Shoenus neocaledonicus*, *Costularia pubescens*, *Costularia nervosa* and *Costularia comosa* which participate for 22% of the PG2 total contribution. The highest constancy ratio was for two woody species, *Sannantha leratii* and *Scaevola beckii* (10,6%) and one species of Cyperaceae, *Lepidosperma perteres* (8%).

### **Phytosociological group 3 (PG3)**

PG3 includes 38 plots from the slope and the pediment. The vegetation cover is a ligno-herbaceous maquis characterised by *Codia montana* and *Lepidosperma perteres* association, more or less dense, which is developed on more or less deep colluvial ferrallitic soils. Their topographic position allows a good water supply. Sixteen species, from the 37 species forming this group, account for 90% of the total contribution (supplementary data 2). Ligneous stratum is 0,5 to 2 m tall and is more dense and abundant than PG2. In decreasing order of contribution, it is composed of species *Sannantha leratii*, *Dracophyllum ramosum*, *Pancheria elliptica*, *Codia montana*, *Styphelia pancheri*, *Stenocarpus umbelliferus*, *Montrouzieria sphaeroidea*

and *Grevillea exul* var. *rubiginosa* (cumulative contribution 49%). Herbaceous stratum could be dense or spread out, made of two cyperaceous species, *Lepidosperma perteres* (in hemisciaphilous situation) and *Costularia pubescens* (in photophilous situation), together showing a cumulative contribution of 13%. Heliophile fern *Pteridium esculentum* is largely represented in this group (contribution 11,4%), and the highest constancy ratio was for *Sannantha leratii* (6,2%) and *Pteridium esculentum* (5,7%), *Dracophyllum ramosum* (4,6%), *L. perteres* and *C. pubescens* (4%).

#### **Phytosociological group 4 (PG4)**

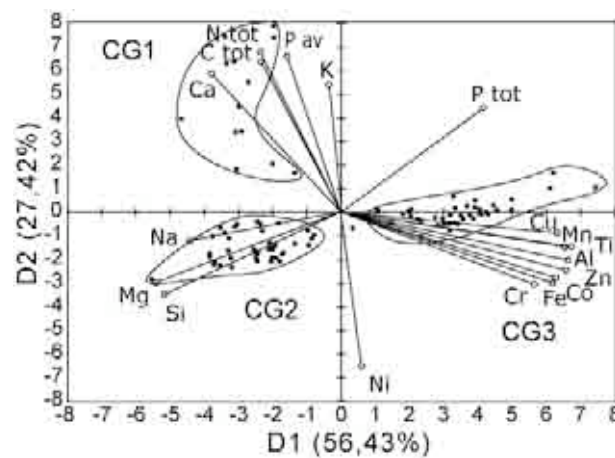
PG4 includes 17 plots in thalwegs with paraforest formation. These plots are located at the bottom of the sequence, flatter and more humid where fire plod away comes in and where the situation is more favourable to plant development. In this group, out of a total of 83 species, 38 species contributed to 90% of total contribution (supplementary data 2). The arborescent stratum is between 8 and 13 m high, including species *Garcinia* sp., *Maxwellia lepidota*, *Austrobuxus carunculatus*, *Alphitonia neocaledonica*, *Macaranga vieillardii*, *Stortocalyx pancheri* and *Geissois pruinosa* (cumulative contribution 17%). The shrubby stratum, relatively dense, mainly includes in decreasing order of contribution *Hibbertia lucens*, *Codia montana*, *Phyllanthus aeneus*, *Soulamea pancheri*, *Geniostoma* sp., *Phyllanthus balanseanus*, *Cloezia artensis* and *Melodinus* sp. (cumulative contribution 29%). Herbaceous stratum is composed of cyperaceous species bearing wet zones: *Lepidosperma perteres*, *Baumea deplanchei*, and *Gahnia novocaledonensis* (cumulative contribution 12%).

### **1.4.2. Soil geochemistry**

#### **1.4.2.1. Bulk soil chemistry**

Chemistry data (see supplementary data) of the soil samples (n=95) were analysed using principal components analysis after n-standardization for the 18 chemical variables. The results after varimax rotation showed that the two first components explained 83,85% of the total variance of the system, the third component only 7,35%. Correlation diagram in the two first components plan exhibited three groups of elements and two isolated elements (Fig 1.5). The first

chemical group (CG1) on positive D2 and negative D1 contained total C, total N, available P, K and Ca, representing the soils rich in organic matter and associated nutrients. On the D1 and D2 negative side Mg, Si and Na are grouped (CG2), which characterized the saprolitic origin of the soil samples. The third chemical group (CG3) on positive D1 and negative D2 side associate Fe with Cr, Co, Zn, Al, Ti, Mn and Cu, belonging to the lateritic imprint of the soil samples. Ni content is isolated between CG2 and CG3 due to its occurrence both in saprolitic and lateritic fingerprints. In the same way, total phosphorus appeared to be shared between CG1 and CG3 either soils rich in organic matter or iron bearing soils.

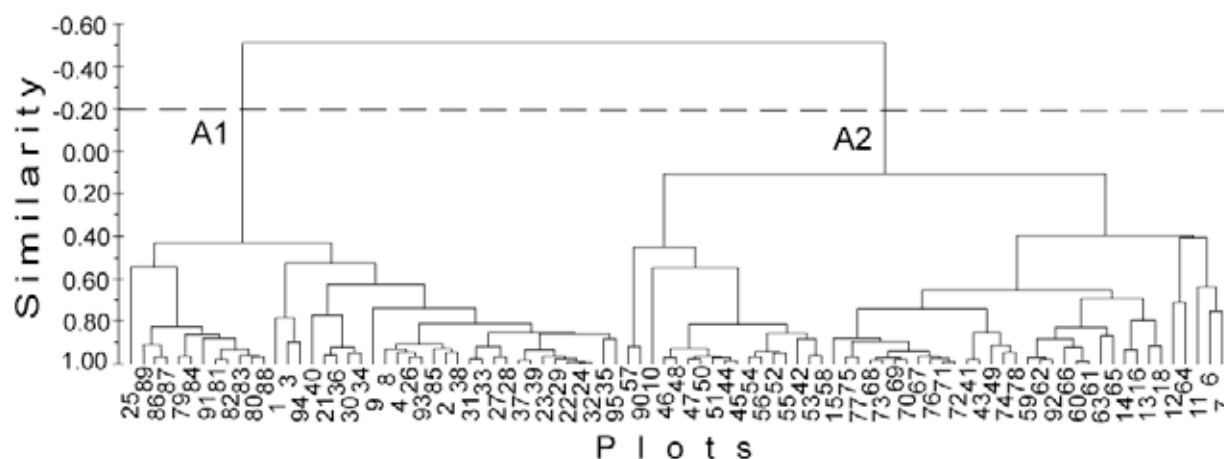


**Figure 1.5.** Principal component analysis and correlation biplot after varimax rotation between 18 chemical variables and 95 samples

#### 1.4.2.2. Soil aqueous extract, total cationic exchange capacity and exchangeable elements

Considering our data of soil aqueous extract (AE), total exchange capacity (CEC) and exchangeable elements as 11 variables, agglomerative hierarchical clustering analysis of soil horizon plots identify possible cuts of the dendrogram (similarity - 0.20) showing two main clusters (Fig 1.6).





**Figure 1.6.** Dendrogram of the agglomerative hierarchical clustering performed on the results of the soils sequence aqueous extractions and CEC (n=91)

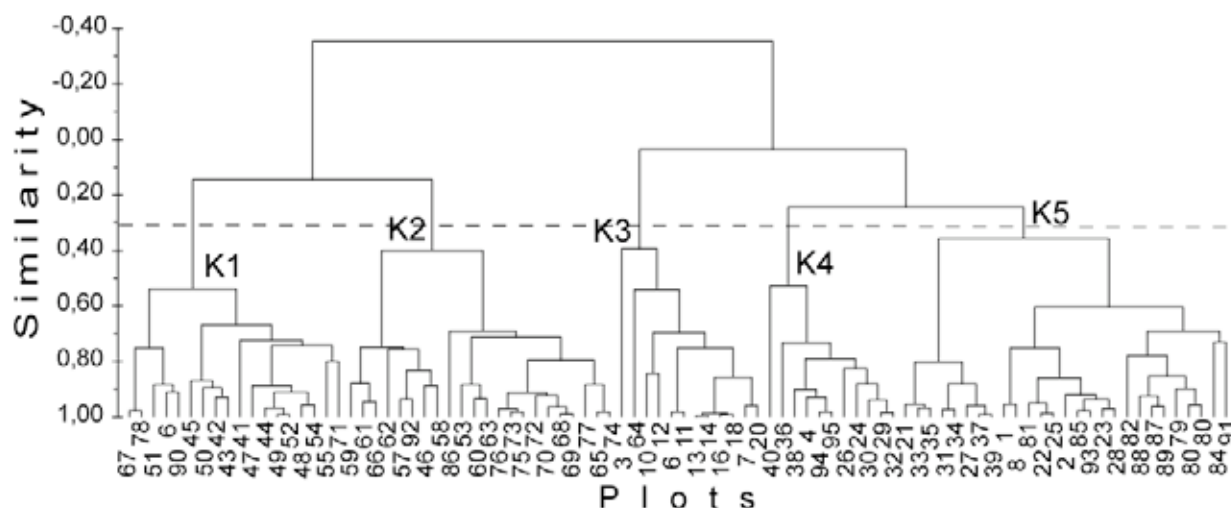
Cluster 1 (A1) corresponded to plots with higher aqueous soluble Mg (AE-Mg) and pH values, elevated exchangeable Mg content (CEC-Mg) and total CEC which characterize the ultramafic origin of the saprolite soils (Table 1.1). Cluster 2 (A2) grouped the plots with lower values in AE-Mg, CEC-Mg and pH. These plots also contained relatively higher values of Ca, K and electric conductivity. These plots belong either to lateritic soils or soils with abundant organic matter. Aqueous extraction and exchangeable cations seem to be bulky markers which cannot discriminate finely soil-vegetation relationships.

**Table 1.1.** Elements ( $\text{cmol kg}^{-1}$ ), pH, electric conductivity (EC in  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) and CEC ( $\text{cmol kg}^{-1}$ ) mean values and mean standard deviations (*italic*) for the two clusters A1 and A2 obtained after agglomerative hierarchical clustering of the soils aqueous extraction and CEC results

Variable	Aqueous extraction						Total CEC and Exchangeable cations				
	Ca	Mg	Na	K	pH	EC	Ca	Mg	Na	K	CEC
A1	0.28	<b>3.31</b>	0.52	0.12	<b>5.88</b>	90	4.19	<b>27.61</b>	0.26	0.26	<b>29.35</b>
n = 41	<i>0.03</i>	<i>0.38</i>	<i>0.03</i>	<i>0.01</i>	<i>0.08</i>	<i>6</i>	<i>0.45</i>	<i>0.99</i>	<i>0.01</i>	<i>0.02</i>	<i>0.72</i>
A2	<b>1.36</b>	1.30	0.83	0.53	5.26	<b>148</b>	<b>10.18</b>	5.72	0.24	0.42	21.98
n = 50	<i>0.42</i>	<i>0.26</i>	<i>0.09</i>	<i>0.11</i>	<i>0.08</i>	<i>27</i>	<i>2.27</i>	<i>2.06</i>	<i>0.04</i>	<i>0.07</i>	<i>2.60</i>

### 1.4.2.3. Soil KCl extract

Agglomerative hierarchical clustering on KCl extraction results for 8 elements identified clearly 2 main groups that are separated in 5 clusters with a similarity coefficient of 0.3 (Fig 1.7).



**Figure 1.7.** Dendrogram of the agglomerative hierarchical clustering performed on the results of the soils sequence KCl extractions (n=80)

The first cluster (K1) is represented by higher Cr-KCl extractable values and contains 18 observations situated on the high part of the colluvial lateritic zone (plots 41 to 55), which stand the ligno-herbaceous maquis on slope in lateritic soils (Table 1.2). The second one (K2), including 22 plots with higher Mn, Co and Ni values, corresponded more to the low part of this lateritic zone (plots 57 to 77) with a taller *Codia montana* maquis formation. These two first clusters constitute the first group that belongs to lateritic soils. Higher values of Na and Ca form the third cluster (K3) that contains 12 observations corresponding to plots with high quantity of organic matter. K3 is mainly composed by plots situated at the top of the toposequence (plots 3 to 20), where paraforest maquis grows on peridotite boulder allowing accumulation of organic matter in the voids. The fourth cluster (K4) correspond to plots with higher Fe-KCl extractable content grouping 11 observations mainly on saprolitic soils (plots 24 to 40). We note that unlike oxi-hydroxide Fe of the lateritic soils, saprolitic Fe is KCl extractable. The last cluster (K5) corresponded to plots with higher Mg KCl-extractable content and grouped 27 observations which are localized either in saprolitic soils, at the top of the sequence, or in the thalweg's colluvial ultramaphic

soils beneath. These cluster K5 would be differentiated into three low level sub-clusters (Fig. 1.7). The first sub-cluster corresponds to plots situated on slope saprolitic soils (some of the plots between plot 21 and 39), the second one corresponds to melting plots between slope saprolitic zones and thalwegs' colluvial soils, the last one corresponds only to plots situated in thalwegs with colluvial saprolitic imprint (some of the plots between plot 79 and 95). K3, K4 and K5 clusters represent the other non-lateritic soils of the sequence in soils with saprolitic origin.

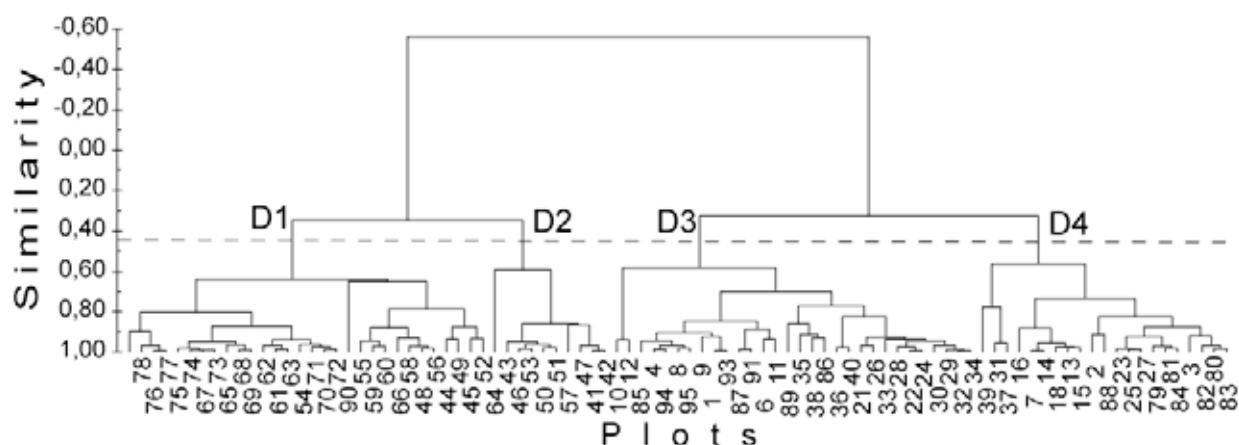
**Table 1.2.** Elements (mg/kg) mean values and mean standard deviations (*italic*) for the five clusters obtained after agglomerative hierarchical clustering of the soils KCl extraction results

Variable	Mn	Ni	Co	Fe	Cr	Mg	Na	Ca
K1	50	7	0.56	0.8	<b>0.32</b>	199	28	611
n = 18	<i>12</i>	<i>1</i>	<i>0.18</i>	<i>0.1</i>	<i>0.05</i>	<i>32</i>	<i>4</i>	<i>106</i>
K2	<b>95</b>	<b>26</b>	<b>0.86</b>	0.5	0.08	252	12	393
n = 22	<i>18</i>	<i>3</i>	<i>0.23</i>	<i>0.1</i>	<i>0.02</i>	<i>109</i>	<i>4</i>	<i>109</i>
K3	27	4	0.35	1.4	-	1528	<b>121</b>	<b>4593</b>
n = 12	<i>4</i>	<i>1</i>	<i>0.09</i>	<i>0.2</i>		<i>147</i>	<i>18</i>	<i>762</i>
K4	19	17	0.25	<b>1.7</b>	-	2357	59	655
n = 11	<i>6</i>	<i>2</i>	<i>0.05</i>	<i>0.2</i>		<i>174</i>	<i>6</i>	<i>113</i>
K5	15	15	0.24	0.7	0.05	<b>3259</b>	49	735
n = 27	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>0.03</i>	<i>0.1</i>	<i>0.01</i>	<i>156</i>	<i>3</i>	<i>118</i>

KCl extraction and measurement of some majors elements and metals of soils seems to give a fairly good separation of the different soils observed on the sequence in conjunction with phytosociologic formations.

#### 1.4.2.4. Soil DTPA extract

Agglomerative hierarchical clustering on the results of DTPA extracted solution for 7 elements allowed to identify two main groups that are separated in 4 clusters with a similarity coefficient of 0.44 (Fig 1.8).



**Figure 1.8.** Dendrogram of the agglomerative hierarchical clustering performed on the results of the soils DTPA extractions (n= 91)

The first cluster (D1) is represented by higher Cr and Mn-DTPA extractible values (Table 1.3) and contained 30 observations situated in colluvial lateritic soils. The second cluster (D2) corresponded to 10 plots with higher Mn, Co and Ni values, which are also situated in colluvial lateritic soils. These two first clusters belongs to lateritic soil and can be linked to their respective low or high position along the slope (Fig 1.8). Higher values of Ni-DTPA and Mg-DTPA form the third cluster (D3) that contains 30 observations corresponding to a mix of plots localised in soils with saprolitic imprint, represented by the peridotite boulder at the top of the sequence, the saprolitic zone just below on the slope and the thalweg's colluvial soils at the bottom. The fourth cluster (D4) corresponded to plots with higher Fe and Mg DTPA-extractible content grouping 21 observations on mainly saprolitic eroded soils in the middle slope.

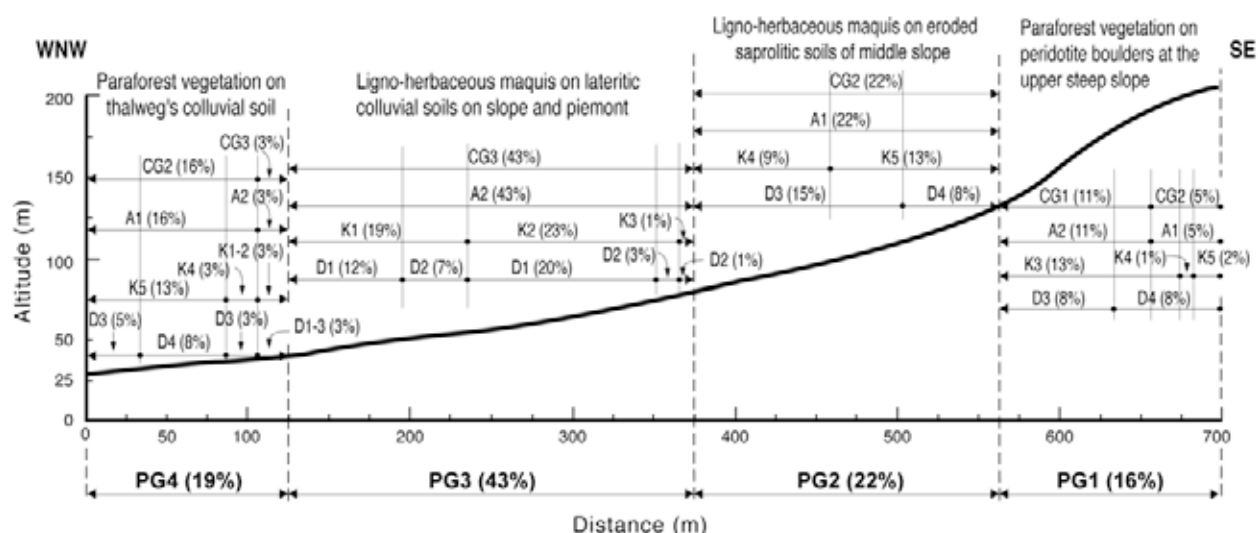
**Table 1.3.** Elements (mg/kg) mean values and mean standard deviations for the four clusters obtained after agglomerative hierarchical clustering of the soils DTPA extraction results

Variable	Mn	Ni	Mg	Fe	Cr	Co	Al
D1	<b>947</b>	76	172	90	<b>0.35</b>	76	51
n = 30	<i>31</i>	<i>12</i>	<i>16</i>	<i>9</i>	<i>0.06</i>	<i>3</i>	<i>8</i>
D2	<b>951</b>	<b>145</b>	334	71	0.08	<b>97</b>	14
n = 10	<i>44</i>	<i>18</i>	<i>27</i>	<i>6</i>	<i>0.02</i>	<i>5</i>	<i>1</i>
D3	654	<b>289</b>	<b>1122</b>	130	0.07	86	13
n = 30	<i>14</i>	<i>7</i>	<i>32</i>	<i>9</i>	<i>0.01</i>	<i>3</i>	<i>1</i>
D4	472	202	<b>1158</b>	<b>239</b>	0.10	53	23
n = 21	<i>36</i>	<i>14</i>	<i>55</i>	<i>17</i>	<i>0.01</i>	<i>7</i>	<i>3</i>

### 1.4.3. Phytosociology versus soil geochemistry

Each statistical treatment attributed a rank to each plot in accordance with phytosociology grouping (PG1 to PG4), bulk chemistry (CG1 to CG3), aqueous extract and CEC (A1 or A2), KCl extractions (K1 to K5) and DTPA extractions (D1 to D4). For each plot we attributed a qualitative rank, consisting in 5 numbers, obtained from concatenation of the respective treatments, which allowed the plots to be classified and grouped each other for all the data they contain. Figure 1.9 summarizes the results and hierarchisation obtained for the 89 plots of the sequence (total 95 minus 6 having data below analytical detection limit). As each statistical treatment showed clear grouping, the resulting figure showed a consistent classification for all the variables contributing to precise the relationships between phytosociology and soil geochemistry. Correlation biplot after varimax rotation between chemical variables and soil samples (Fig 1.5) clearly showed the adequacy to grouping chemical variables with observations. Chemical group 1 (CG1) is related to organic matter rich soils, Chemical group 2 (CG2) to saprolite and Chemical group 3 (CG3) to lateritic soils. Furthermore if we compared the chemical groups with those from phytosociology (Fig 1.4), correspondences appear between vegetation, soil and bulk chemistry. The lateritic soils rich in Fe and associated metals (CG3) are covered by phytosociological group (PG3). The plots corresponding to saprolitic soils (CG2) rich in Si and Mg is defined both the PG2 and PG4 plant communities. On the same way, the plots with rich organic layer and nutrients (CG1) correspond to PG1 plant community.

The flora distribution and all geochemical parameters discriminated two main ecosystems, developing, respectively, on typical saprolitic and lateritic soils. These are two ligno-herbaceous maquis plots, which are dominated by families including Cunoniaceae, Myrtaceae, Proteaceae, Ericaceae and Cyperaceae, with a main canopy of 1-2 m high.



**Figure 1.9.** Hierarchisation obtained for the 89 plots of the sequence in accordance with phytosociology grouping (PG1 to PG4), bulk chemistry (CG1 to CG3), aqueous extract and CEC (A1 or A2), KCl extractions (K1 to K5) and DTPA extractions (D1 to D4)

#### 1.4.3.1. Saprolitic ecosystem

Saprolitic ecosystem (PG2, CG2, A1; 22% of all the plots; Fig 1.9) reveals an ultramafic imprint, with total Si, Mg, Na and AE-Mg, CEC-Mg and basic pH. KCl extractions divide this whole ecosystem in two subgroups according to K4 with KCl-Fe content (9%) or to K5 (13%) with KCl-Mg content (Fig 1.7). The first subgroup has a high level of extractible DTPA Mg and Ni (D3). The other subgroup is divided according to extractible DTPA Mg and Fe (D4, 8%) and remaining of extractible DTPA Mg and Ni (D3, 5%) (Fig 1.8). This ecosystem contains typical pioneer plant species and it is characterised by the occurrence of a great number of sedges (*Costularia arundinacea*, *Costularia nervosa*, *Schoenus neocaledonicus*, *Lepidosperma perteres* and *Baumea deplanchei*) and numerous woody species, regenerated from root stocks. This formation could be related to the *Costularia ssp.* and *Styphelia albicans* association previously described by Jaffré (1980). We note that two species appear exclusively in this ecosystem (*Myodocarpus nervatus* and *Geniostoma densiflorum*) and two species of *Costularia* (*Costularia arundinaceae*, *Costularia nervosa*) appear exclusively in saprolitic ecosystem. Although Jaffré and Pelletier (1992) have described these pioneer sedge as ubiquist. Nevertheless, they do not exclude the existence of ecotype.

#### 1.4.3.2. Lateritic ecosystem

Lateritic ecosystem (PG3, CG3, A2, 43%) shows a genuine imprint with total Fe, Cr, Mn, Co and aqueous soluble Ca (AE-Ca), AE-Na, AE-K and exchangeable Ca content (CEC-Ca) and CEC-K. KCl extractions separated this ecosystem into two main subgroups, according to either the Cr content (K1, 19%) or the Mn, Co, Ni content (K2, 23%) and a third minor subgroup influenced by high organic matter (K3, 1%). This separation seems to be due to the plot's position in the toposequence (Fig 1.7). The first subgroup (PG3-CG3-A2-K1) mainly assembles plots at the top of the lateritic ecosystem (plots 41 to 56) with high goethite and chromite (Cr) content (Quantin et al. 1997; Becquer et al. 2003). The second (PG3-CG3-A2-K2) is composed with plots at the bottom of piedmont on which soils have high goethite heavy metal contents (Mn, Co, Ni). All the plots of this ecosystem are characterised either by extractible DTPA Mn, Cr (D1, 12%) or extractible DTPA Mn, Co (D2, 7%), which are respectively, chromite or asbolane weathering mineral imprints. Flora is characterised by the occurrence of numerous ligneous typical pioneer plant species, two pioneer sedges (*Lepidosperma perteres* and *Costularia pubescens*) and a characteristic fern of fire passage (*Pteridium esculentum*). This formation could be related to piedmont plain *Codia discolor* association previously described by Jaffré (1980). The studied sequence shows that none of the species present in this ecosystem is strictly exclusive. However, *Pancheria elliptica* and *Stenocarpus umbelliferus* seem to be favourable to this lateritic ecosystem. Chemical composition of lateritic soils indicate a poverty in nutrients less accentuated than in saprolitic ecosystem. This can promote a higher growth of vegetation and, thus, the development of shade-loving species.

#### 1.4.3.3. Paraforest ecosystem

The two other phytosociological groups (PG1 16% and PG4 19%) are represented by higher vegetation and a greater diversity with a mix of maquis and forest species. These two phytosociological groups have totally opposite positions in the sequence, one is a dry top slope formation and the other is a thalweg formation with better water supply. These two groups share 41 % of their species, with six of which having a good percentage contribution in the two groups (*Styphelia pancheri*, *Hibbertia vieillardii*, *Soulamea pancheri*, *Austrobuxus carunculatus*, *Phyllanthus balanseanus* and *Lepidosperma perteres*).

Geochemical characteristics of top slope paraforest formation (PG1) are divided between an organic matter rich soil imprint (CG1, A2, K3, 11%) and a saprolitic soil imprint (CG2, A1, K4 or K5, 3%) according to the samples taken amongst the boulders, respectively either rich in organic matter or in weathering serpentine material. Both plots from this formation have a high DTPA-Mg, Ni and Fe content (D3 and D4) linked to peridotite bedrock weathering at this sequence level. Flora (PG1) is characterised by numerous top slope maquis or exclusively paraforest species (26% of the total species present in this formation) often linked to moisture deficit in dry periods (as *Homalium deplanchei* and *Diospyros vieillardii*) and by a poor herbaceous stratum. The legume species *Arthroclianthus sp.* seems to predominate in organic zones, rich in DTPA-Mg.

The thalweg paraforest formation (PG4) reveals two types of geochemical characteristics, according to the colluvions: 11% of the plots have a saprolitic soil imprint (CG2, A1, K4 or K5 and D3 or D4) linked with colluvial contribution of up stream saprolitic zones, and about 3% (plots 86, 90 and 92) have a lateritic soil imprint (CG1, A2, K1 or K2 and D1) linked with colluvion lateritic slope above the thalweg. Flora in this group (PG4) is the most diversified of the study site and is characterised by numerous maquis or paraforest exclusive species (35 % of total species present in this formation). Some of the present herbaceous species are able to develop in humid environment (*Gahnia novocaledonensis*, *Baumea deplanchei*, *Lepidosperma perteres*).

## 1.5. Discussion

Our ultramafic sequence shows valuable relationships between the soil geochemistry and plant formations. Vegetation types differed along the soil surface properties that vary in concentration and in availability for heavy metals and nutrients. First, our results support the hypothesis that the mineral characteristics of ultramafic soils strongly impact on the vegetation structure (Enright et al. 2001; Jaffré 1980; Lee et al. 1977; Lombini et al. 1998; Read et al. 2006; Robinson et al. 1997). Regarding these characteristics, vegetation species and types vary in relation with soil position and weathering in the sequence and with water availability (Perrier et al. 2006a; Quantin et al. 1997). Secondly, the results are also in accordance with the hypothesis of the bacterial weathering effect on heavy metal mobility, in relation with the organic matter factor (Amir and Pineau 2003; Perrier et al. 2006b; Quantin et al. 2001, 2002).



On our sequence, organic matter is linked to CG1 with available phosphorus and other nutrients but also with high extractible metals transition content (Ni, Mg and Fe). Mg and Ni are easily available in weathering saprolitic rocks (silicate) (Perrier et al. 2006b; Quantin et al. 1997) and they are probably mainly toxic factors and causal factors for plant distribution in ultramafic soils (Brady et al. 2005; Nagy and Proctor 1997).

Saprolitic and lateritic maquis ecosystems are not very dynamic vegetations. They are constituted by metal tolerant and impoverished soil adapted pioneer species (Jaffré et al. 1994; Morat et al. 1986). Available chemical elements in lateritic and saprolitic soils are different and seem to play an important role in the differentiation of plant formations. These differences are the availability of Mg, Ni, Mn, Co, Cr and could explain the partition of these two formations. Indeed, in our sequence, calcium deficiency and high levels of magnesium in the soils create an unfavourable Ca/Mg ratio, which probably leads to poor calcium assimilation and specific tolerance to Mg (Brady et al. 2005; Kazakou et al. 2008), but this ratio is less unbalanced in lateritic soil than in eroded saprolitic soils (due to the topography and nature of substratum). Furthermore, in lateritic soils, Mn, Co and Ni associated with Mn-oxide and Fe-oxide are more easily mobilizable by chemical and bacterial reduction conditions than in saprolitic soils. Also, in plane colluvial lateritic zones, Mn and Ni are the most abundant available elements and can be toxic for plants (L'huillier and Edighoffer 1996; Perrier et al. 2006a; Rigault et al. 1997). Highly extractible Co values appear in asbolane mineral rich soils, on lateritic piedmont, but toxicity of this element has not been assessed. In the weathering peridotite profile, asbolane minerals are present in the transition zone between laterite and saprolite, and it can be present in the surface layer after colluvial lateritic events (Becquer et al. 2006; Quantin et al. 1997). Cr behaviour has been poorly investigated in New Caledonia ecosystem. The plant uptake of Cr is generally very low (Jaffré 1980). Cr in soils appears mostly as solid phases such as chromite and Cr substituted goethite, which are extremely insoluble. Thus, Cr is present in the soil chemical extracts under natural vegetation, however its retention on the Fe-oxides limits its mobility and toxicity (Becquer et al. 2003). Plants present on ultramafic soils are adapted to these multiple drastic conditions, but at various levels (elements, concentration tolerance, competition...).

Fire has evidently been a factor shaping the vegetation and the grouping of species before human arrival and after. It may have influenced the evolution of the flora (McCoy et al. 1999). Fire history of the study site has been estimated, however, the exact boundaries of past fires are rarely known. Thus, this disturbance has been implicated in maintaining maquis (Jaffré et al. 1998; McCoy et al. 1999), but this does not exclude edaphic controls on the vegetation type's distribution. Numerous woody species regenerate from root stocks showing the fire tolerance of the two woody-herbaceous maquis types. The formation of a new plant cover after maquis burning is slow and is the result of a self-succession enabling the vegetation to return to maquis assuming that no additional fires occur. Open areas were largely occupied by a single rhizomatous sedge species (*Lepidosperma perteres*), which unlike other species of Cyperaceae is resistant to the spread of fire (Jaffré et al. 1998). Tussock Cyperaceous stratum (*Costularia* sp. and *Schoenus* sp.) is vulnerable to fire and does not remain after burning. The reinstalment of these Cyperaceae is very slow, carried out during 4 to 6 years and then increases (Jaffré et al. 1998). This process of vegetation recovery can however be interrupted by premature burning events, which allows a proliferation of *Pteridium esculentum*, a highly flammable fern species which facilitates the spread of fire. Repeated burnings can thus result in the establishment of a permanent fern cover with a repeated destruction of the soil organic matter and structure. In extreme conditions, a bare soil with superficial encrusting appears.

## 1.6. Conclusion

Vegetation assemblies follow morphologic and edaphic zonings. Our results provide essential information for the post mining restoration: top soil management and revegetation. Pioneer species must be introduced in conformity with the proper factors of the given soils to be revegetated. When the substratum is a mixture of different soil types, it is advised to use ubiquitous species to these different soils (in our study site: *Hibbertia lucens* and *H. vieillardii*, *Styphelia pancheri* and *S. cymbulae*, *Sannantha leratii*, *Grevillea* spp., *Alphitonia neocaledonica*, *Peripterygia marginata*). This work shall enable the use of improved and optimised reconstruction techniques, using topsoil and endemic species, in order for the ecological succession to begin. Each mining zone should be subject to phytogeochemistry studies, to determine which species association to recommend according to the soil to be revegetated. Data of the transition zone should be broadened to understand

phytogeochemical organisation along a toposequence. It will be interesting to study the degree to which other factors such as lack of nutrients and drainage control the nature of the overlying flora, and how these factors are linked to edaphic factor in the shaping of vegetation.

### **Acknowledgement**

This work was supported by IRD, CEREGE, UMR 161 and European funds Sysmin. Authors greatly acknowledge SIRAS Pacific Company for providing a PhD grant to Alexandre Lagrange.

## Supplementary data 1.

## Chemical analysis of the total element in soil used for Principal Component Analysis

Plots n°	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	Total N (g kg <sup>-1</sup> )	Total C (g kg <sup>-1</sup> )	C/N	available P (mg kg <sup>-1</sup> )	Total P (mg kg <sup>-1</sup> )	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Na (mg kg <sup>-1</sup> )	K (mg kg <sup>-1</sup> )	Ti (g kg <sup>-1</sup> )	Fe (g kg <sup>-1</sup> )	Co (g kg <sup>-1</sup> )	Cr (g kg <sup>-1</sup> )	Mn (g kg <sup>-1</sup> )	Ni (g kg <sup>-1</sup> )	Al (g kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Si (g kg <sup>-1</sup> )	Zn (g kg <sup>-1</sup> )
1	6,9	6,0	1,6	39	24	2,3	8	7	91	1038	259	0,43	184	0,42	21,0	3,4	6,0	17,6	45,4	116	0,19
2	7,0	6,0	1,7	35	21	2,3	14	10	88	1875	397	0,53	149	0,30	18,6	2,6	3,5	22,3	48,4	137	0,12
3	6,8	6,0	2,0	56	28	2,3	13	6	110	1098	464	0,31	124	0,28	11,2	2,1	5,8	12,6	18,4	129	0,12
4	6,8	5,9	2,0	43	22	2,3	11	8	78	1457	533	0,40	153	0,35	10,0	3,1	5,1	17,6	33,7	132	0,12
5	7,0	5,5	7,5	220	29	13,7	119	15	38	785	580	0,18	67	0,17	9,0	1,3	2,6	6,8	19,5	101	0,08
6	6,3	5,7	5,5	219	40	4,6	71	13	39	753	396	0,21	115	0,29	10,0	2,1	3,6	9,9	20,0	104	0,10
7	5,9	5,3	8,2	221	27	13,7	116	17	6	414	421	0,05	12	0,03	1,3	0,3	0,5	1,5	8,2	108	0,02
8	7,0	6,1	3,1	61	19	2,3	32	6	79	777	299	0,23	159	0,37	12,7	2,9	4,8	13,9	16,6	122	0,14
9	6,7	5,9	3,4	67	20	2,3	24	8	53	872	355	0,39	176	0,42	16,8	3,2	5,2	17,3	21,5	119	0,17
10	6,9	6,3	3,4	53	16	2,3	55	14	108	1988	347	0,68	155	0,34	11,5	2,7	5,4	18,7	15,7	129	0,13
11	6,9	6,3	6,9	220	32	4,6	87	14	68	1284	595	0,42	134	0,34	10,7	2,8	4,5	14,5	21,6	102	0,15
12	7,2	6,6	5,0	202	41	4,6	95	16	68	1873	544	0,61	183	0,42	15,3	3,3	4,1	19,4	17,9	113	0,17
13	6,6	6,1	11,0	219	20	22,9	206	29	11	320	681	0,04	15	0,04	1,8	0,5	0,6	1,5	12,7	19	0,07
14	6,8	6,3	13,2	222	17	29,8	345	37	19	247	545	0,06	15	0,04	1,7	0,6	0,6	1,7	15,6	24	0,03
15	6,4	5,9	11,4	219	19	16,0	230	36	7	350	1200	0,02	6	0,01	0,4	1,0	0,3	0,5	11,9	23	0,02
16	6,7	6,2	10,6	218	21	18,3	248	28	31	600	554	0,22	51	0,12	6,4	3,2	1,2	6,2	10,5	42	0,07
17	6,2	5,7	11,3	222	20	25,2	235	33	6	306	1256	0,02	5	0,01	0,4	1,0	0,3	0,6	11,7	21	0,01
18	6,6	6,1	8,7	218	25	16,0	209	20	42	491	668	0,16	61	0,15	5,2	1,4	2,0	6,4	18,3	83	0,05
19	6,5	6,0	7,7	219	28	11,5	118	19	40	449	520	0,17	92	0,24	11,7	2,1	2,7	8,0	12,8	71	0,11
20	6,3	5,8	10,7	223	21	20,6	219	28	11	170	778	0,03	10	0,03	0,7	0,5	0,4	1,0	8,9	44	0,03
21	6,3	5,6	1,6	52	32	2,3	4	9	59	1275	187	0,64	187	0,49	21,8	4,8	4,2	20,8	14,5	109	0,14
22	6,8	5,9	1,3	23	17	0,0	0	4	56	432	144	0,42	234	0,60	27,2	5,4	7,3	19,1	14,7	105	0,27
23	7,5	6,3	0,5	6	14	0,0	0	2	115	345	34	0,16	122	0,28	17,3	2,3	5,9	9,7	6,9	157	0,14
24	6,7	5,7	1,1	15	14	0,0	0	4	50	545	140	0,46	229	0,56	28,3	5,5	7,1	23,7	13,8	104	0,29
25	7,2	6,1	0,5	6	12	0,0	0	4	60	696	77	0,43	183	0,40	23,3	3,0	6,6	18,1	19,7	131	0,20
26	6,6	5,8	1,7	35	21	0,0	0	6	55	827	320	0,56	230	0,65	30,3	6,3	5,4	21,8	13,9	95	0,28
27	7,1	6,0	0,5	7	14	0,0	0	6	69	1106	211	0,59	185	0,47	28,8	3,9	4,3	24,3	15,1	120	0,24
28	6,9	6,0	1,1	17	15	0,0	0	7	56	1077	251	0,58	237	0,56	23,4	4,8	6,8	22,7	14,6	108	0,26
29	6,5	5,7	1,7	31	19	0,0	7	8	52	1234	206	0,69	228	0,65	11,0	6,2	6,5	21,9	15,8	109	0,21
30	6,4	5,7	1,2	32	28	0,0	0	6	40	768	155	0,54	241	0,65	18,1	6,1	7,3	23,4	17,0	92	0,24
31	6,7	5,7	0,7	10	14	0,0	0	4	35	522	56	0,56	244	0,61	13,3	4,9	7,2	25,4	14,2	95	0,23
32	6,5	5,7	1,5	28	19	2,3	0	5	42	669	166	0,53	246	0,65	13,7	5,7	6,8	21,5	15,2	98	0,23
33	6,4	5,6	1,1	19	17	0,0	0	4	35	658	91	0,60	272	0,70	14,4	5,6	7,4	23,2	15,9	89	0,24
34	6,4	5,6	1,5	36	24	0,0	0	6	43	788	171	0,57	246	0,64	12,1	5,9	7,0	20,0	15,0	102	0,23
35	6,1	5,5	1,4	40	30	0,0	0	8	38	1214	156	0,84	251	0,64	15,0	5,2	6,5	26,6	19,8	88	0,24
36	6,0	5,4	2,2	69	32	0,0	20	10	41	1371	194	0,79	238	0,66	17,8	6,2	6,1	24,3	19,6	86	0,24
37	6,7	5,7	1,0	19	19	0,0	0	3	36	534	195	0,74	223	0,66	16,7	5,5	6,9	26,6	16,7	109	0,23
38	6,4	5,7	1,5	35	23	0,0	0	6	36	913	187	0,79	274	0,76	15,9	6,2	6,8	26,8	18,3	81	0,26
39	6,8	5,7	0,8	9	11	2,3	2	6	54	903	26	0,66	163	0,41	12,4	3,4	6,5	19,3	16,8	147	0,18
40	5,9	5,4	1,8	53	29	0,0	0	5	29	723	130	0,80	252	0,64	20,1	7,0	5,6	26,0	23,5	71	0,26
41	6,1	5,8	1,2	32	27	0,1	122	2	18	140	191	1,39	381	1,12	33,2	10,0	5,8	40,5	44,7	56	0,41
42	6,4	6,0	1,2	25	20	0,0	126	2	19	98	109	1,35	381	1,09	26,5	8,8	6,4	39,4	43,0	55	0,39
43	6,2	5,9	1,4	34	25	0,2	124	2	12	133	342	1,56	387	0,94	30,1	9,9	5,1	46,3	51,6	44	0,41
44	6,0	5,9	1,0	18	19	0,0	198	1	12	88	202	2,06	374	0,99	24,1	9,5	4,9	58,0	56,6	58	0,37
45	6,2	6,2	0,8	17	23	1,3	241	1	10	24	181	1,86	411	0,84	23,6	8,4	5,2	54,9	56,9	42	0,37
46	5,9	5,6	1,4	38	27	1,8	156	2	13	196	332	1,92	351	0,92	31,6	10,4	4,8	52,7	53,8	61	0,38
47	6,2	5,9	1,3	33	25	1,6	188	2	13	67	163	1,56	383	0,93	29,0	9,1	5,2	46,6	45,9	49	0,37
48	5,8	5,6	1,2	32	27	1,1	305	1	9	30	123	2,50	349	0,83	30,5	9,8	4,2	68,0	60,3	61	0,34
49	6,0	5,8	0,9	21	23	3,1	150	1	12	119	99	1,70	400	0,90	29,7	9,8	5,2	50,8	50,0	45	0,37

Plots n°	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	Total N (g kg <sup>-1</sup> )	Total C (g kg <sup>-1</sup> )	C/N	available P (mg kg <sup>-1</sup> )	Total P (mg kg <sup>-1</sup> )	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Na (mg kg <sup>-1</sup> )	K (mg kg <sup>-1</sup> )	Ti (g kg <sup>-1</sup> )	Fe (g kg <sup>-1</sup> )	Co (g kg <sup>-1</sup> )	Cr (g kg <sup>-1</sup> )	Mn (g kg <sup>-1</sup> )	Ni (g kg <sup>-1</sup> )	Al (g kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	Si (g kg <sup>-1</sup> )	Zn (g kg <sup>-1</sup> )
50	6,4	6,0	1,2	27	22	1,1	144	2	12	63	139	1,88	376	0,93	27,3	9,7	5,2	54,3	52,5	52	0,37
51	5,9	5,7	0,9	26	28	4,2	131	1	12	60	93	1,66	398	0,83	31,5	8,3	5,5	50,4	50,9	42	0,38
52	5,5	5,8	0,7	19	25	1,7	185	0	8	0	28	1,93	401	0,85	27,3	7,1	5,0	58,9	58,3	31	0,37
53	5,8	5,5	1,2	33	28	1,9	177	1	14	75	104	1,43	398	0,92	32,4	9,8	5,7	43,4	47,8	43	0,39
54	5,2	5,4	1,0	23	24	2,1	165	0	8	0	58	1,81	412	0,84	32,9	9,3	4,4	55,9	55,2	30	0,38
55	5,5	5,5	0,9	22	24	1,5	241	1	9	85	135	1,64	413	0,95	27,3	12,0	5,1	49,0	59,1	34	0,46
56	5,7	5,6	0,9	29	32	2,1	252	1	8	59	140	1,64	409	0,77	35,0	9,6	4,1	53,0	57,8	29	0,37
57	6,0	5,4	2,5	84	33	3,5	137	4	16	182	148	1,20	334	0,89	27,3	11,6	5,3	35,1	37,2	67	0,33
58	5,4	5,3	1,0	31	30	1,5	151	0	8	0	0	1,73	400	0,91	31,7	10,6	4,8	54,2	50,2	28	0,39
59	5,2	5,3	1,2	28	23	2,3	138	1	8	84	81	1,62	343	1,06	17,7	13,1	4,6	46,8	53,0	30	0,35
60	5,4	5,1	1,4	41	29	2,3	123	1	10	78	100	1,45	320	1,07	22,0	12,8	4,7	42,3	45,7	42	0,33
61	5,5	5,3	1,7	47	27	2,3	144	1	6	159	141	1,61	333	0,93	24,0	13,1	4,2	50,0	55,4	26	0,37
62	5,7	5,5	1,8	50	28	2,3	137	1	7	21	91	1,64	325	0,99	23,5	12,0	4,2	49,6	51,9	25	0,37
63	5,4	5,2	1,2	46	38	0,0	104	1	9	69	129	1,49	312	0,93	19,8	12,1	4,8	43,4	42,7	47	0,33
64	6,4	5,9	2,0	45	23	0,0	87	4	16	198	263	1,12	292	0,98	18,5	10,0	6,0	33,2	34,2	62	0,32
65	5,7	5,4	2,0	55	27	0,0	93	3	13	292	263	1,18	295	1,03	20,4	12,0	5,2	33,3	34,9	63	0,32
66	5,5	5,2	2,4	58	25	4,6	122	2	9	138	349	1,48	300	0,92	23,1	13,8	4,5	44,4	42,4	40	0,33
67	5,7	5,6	1,8	34	19	2,0	180	1	8	158	873	1,95	393	1,16	42,4	13,1	5,4	55,3	62,2	43	0,52
68	5,5	5,2	2,1	40	19	2,5	163	2	11	463	858	1,64	365	1,11	34,6	13,6	5,4	46,2	58,7	67	0,41
69	5,7	5,3	2,6	50	19	2,5	148	2	12	214	1318	1,52	358	1,07	32,4	12,0	6,0	42,8	46,3	74	0,42
70	5,3	5,0	2,5	56	22	3,7	205	1	6	139	253	1,83	363	1,07	31,0	15,8	4,6	52,6	51,1	56	0,43
71	5,3	5,2	2,0	39	20	4,0	223	0	6	42	25	1,93	399	1,10	37,0	14,4	4,6	58,0	50,5	34	0,46
72	5,3	5,1	2,0	37	18	3,5	188	1	7	199	176	1,88	398	1,07	33,1	13,6	4,8	51,2	44,5	46	0,45
73	5,5	5,3	2,2	42	19	4,0	188	1	10	195	141	1,70	393	1,16	32,8	14,1	5,1	47,5	44,7	56	0,42
74	5,7	5,5	2,0	33	16	3,5	205	1	8	91	107	1,72	410	1,13	32,6	13,4	5,2	48,0	39,8	42	0,44
75	5,5	5,3	1,9	37	19	4,3	192	1	5	115	66	1,68	416	0,93	30,8	10,2	5,1	48,3	37,4	27	0,42
76	5,3	5,1	2,1	43	21	4,5	180	0	1	125	28	1,62	439	0,52	29,9	5,4	4,8	45,3	34,9	16	0,38
77	5,7	5,4	2,0	43	21	4,3	178	1	0	200	214	1,49	454	0,50	31,0	4,3	5,6	44,5	34,5	5	0,37
78	5,8	5,6	1,9	39	21	14,8	163	1	1	1	15	1,37	461	0,56	31,8	4,6	5,9	42,7	25,3	9	0,38
79	7,2	6,3	0,7	13	19	0,7	77	6	92	1132	152	0,74	199	0,50	17,7	4,5	6,0	22,4	29,8	162	0,18
80	7,0	6,1	1,6	39	24	1,3	46	5	84	650	9	0,60	176	0,37	15,5	3,2	5,3	18,7	26,5	172	0,14
81	7,2	6,2	0,8	18	22	0,5	51	5	99	678	28	0,61	182	0,46	16,6	4,3	5,5	19,9	24,1	170	0,17
82	7,0	6,1	1,2	27	24	1,5	51	5	95	644	19	0,60	182	0,42	17,7	3,5	5,9	19,9	23,9	169	0,16
83	7,0	6,1	1,4	29	21	2,2	41	5	85	807	113	0,65	195	0,47	16,0	4,0	6,2	20,2	24,6	163	0,15
84	7,3	6,5	1,2	28	24	2,7	35	7	91	988	65	0,74	217	0,60	16,6	5,8	5,6	23,1	25,1	142	0,19
85	6,9	6,0	1,9	33	18	2,3	24	4	64	688	237	0,54	148	0,31	14,6	2,5	3,9	17,4	16,0	125	0,14
86	6,4	5,7	2,0	43	22	0,0	272	2	33	211	52	0,92	313	0,64	29,2	5,1	5,9	31,3	48,1	99	0,24
87	6,9	6,1	1,9	47	25	0,0	53	4	76	478	105	0,52	208	0,40	26,7	3,8	5,7	20,1	39,1	159	0,18
88	6,9	6,2	1,2	51	43	0,0	103	4	80	333	181	0,46	217	0,51	21,0	3,3	6,1	18,4	26,6	139	0,21
89	6,8	6,1	1,4	35	25	0,0	54	3	61	328	130	0,55	265	0,68	17,0	4,0	7,1	21,4	32,2	129	0,22
90	6,0	5,7	1,9	50	26	2,0	336	2	8	54	155	1,46	402	0,94	35,3	10,4	5,2	46,6	50,0	28	0,36
91	7,0	6,2	2,2	42	19	0,0	78	5	93	326	132	0,38	178	0,38	15,8	2,9	6,0	14,7	24,1	163	0,16
92	5,4	5,2	1,8	39	22	2,3	141	1	8	10	26	1,42	374	0,96	18,7	10,2	5,0	46,3	46,0	30	0,33
93	6,9	6,1	2,0	37	18	0,0	19	4	69	397	181	0,43	197	0,51	12,3	3,2	6,2	17,2	17,2	124	0,18
94	6,9	6,1	2,0	37	19	2,3	67	4	57	425	233	0,51	170	0,38	15,3	3,0	3,8	17,4	19,5	103	0,09
95	6,7	5,9	2,7	41	15	4,6	75	4	71	470	152	0,47	171	0,43	17,6	3,3	5,8	17,1	14,7	126	0,19

**Supplementary data 2.**

SIMPER (Similarity Percentage) analysis – species contribution up 95% to the average Bray Curtis similarity in phytosociological groups 1, 2, 3, 4

group n° 1	Species	Average Similarity Si	Ratio Sim/SD	Contribution % Si	Cumulative contribution %
PG1	<i>Alyxia tisserantii</i>	3,46	4,76	5,56	5,56
PG1	<i>Soulamea pancheri</i>	3,27	5,99	5,24	10,8
PG1	<i>Eugenia gacognei</i>	3,12	1,81	5,01	15,81
PG1	<i>Hibbertia vieillardii</i>	3,11	4,17	4,99	20,8
PG1	<i>Casearia sylvana</i>	3,09	13,41	4,97	25,77
PG1	<i>Osmanthus austrocaledonicus</i>	2,97	2,51	4,76	30,53
PG1	<i>Dodonea viscosa</i>	2,95	5,39	4,73	35,26
PG1	<i>Lepidosperma perteres</i>	2,5	1,49	4,01	39,27
PG1	<i>Cassytha filiformis</i>	2,48	2	3,99	43,26
PG1	<i>Austrobuxus carunculatus</i>	2,35	1,88	3,77	47,03
PG1	<i>Schizaea intermedia</i>	2,22	1,57	3,57	50,59
PG1	<i>Ixora collina</i>	2,12	1,47	3,4	54
PG1	<i>Wikstroemia indica</i>	2,02	2	3,25	57,24
PG1	<i>Phyllanthus balanseanus</i>	1,97	1,29	3,15	60,4
PG1	<i>Styphelia pancheri</i>	1,93	1,45	3,1	63,49
PG1	<i>Stenocarpus milnei</i>	1,88	1,34	3,02	66,52
PG1	<i>Diospiros Vieillardii</i>	1,72	0,8	2,76	69,27
PG1	<i>Eugenia stricta</i>	1,66	0,92	2,66	71,93
PG1	<i>Rapanea asymetrica</i>	1,64	1,14	2,63	74,57
PG1	<i>Artroclianthus sp.</i>	1,61	1,06	2,59	77,15
PG1	<i>Geniostoma rupestre</i>	1,34	0,92	2,14	79,3
PG1	<i>Homalium deplanchei</i>	1,28	0,89	2,06	81,36
PG1	<i>Letedon tannensis</i>	1,15	0,87	1,85	83,21
PG1	<i>Becariella crebrifolia</i>	1,05	0,75	1,69	84,9
PG1	<i>Jasminum simplicifolium</i>	0,88	0,69	1,41	86,31
PG1	<i>Capparis sp.</i>	0,88	0,6	1,41	87,72
PG1	<i>Scaevola montana</i>	0,76	0,66	1,22	88,94
PG1	<i>Peripterygia marginata</i>	0,61	0,52	0,98	89,92
PG1	<i>Cloezia artensis</i>	0,54	0,46	0,86	90,78
PG1	<i>Dianella sp.</i>	0,52	0,46	0,84	91,62
PG1	<i>Gahnia aspera</i>	0,52	0,46	0,84	92,46
PG1	<i>Costularia arundinacea</i>	0,44	0,41	0,71	93,17
PG1	<i>Solmsia callophylla</i>	0,33	0,39	0,54	93,71
PG1	<i>Morinda sp.</i>	0,3	0,46	0,48	94,19
PG1	<i>Alphitonia neocaledonica</i>	0,3	0,47	0,48	94,67
PG1	<i>Parsonsia sp.</i>	0,29	0,39	0,47	95,14

group n° 2	Species	Average Similarity Si	Ratio Sim/SD	Contribution % Si	Cumulative contribution %
PG2	<i>Costularia arundinacea</i>	5,94	4,03	8,51	8,51
PG2	<i>Cloezia artensis</i>	5,21	5,56	7,46	15,97
PG2	<i>Lepidosperma perteres</i>	4,75	8,01	6,8	22,76
PG2	<i>Pancheria alaternoides</i>	4,63	3,38	6,63	29,39
PG2	<i>Sannantha leratii</i>	4,58	10,61	6,56	35,95
PG2	<i>Scaevola beckii</i>	4,58	10,61	6,56	42,51
PG2	<i>Cassytha filiformis</i>	4,37	5,16	6,25	48,76
PG2	<i>Hibbertia vieillardii</i>	4,14	4,52	5,92	54,68
PG2	<i>Eriaxis rigida</i>	3,9	2,54	5,58	60,26
PG2	<i>Peripterygia marginata</i>	3,67	1,98	5,26	65,53
PG2	<i>Grevillea gillivrayi</i>	3,29	1,78	4,71	70,24
PG2	<i>Scaevola montana</i>	3,15	1,69	4,51	74,75
PG2	<i>Normandia neocaledonica</i>	2,11	1	3,03	77,77
PG2	<i>Geniostoma densiflorum</i>	1,75	1,12	2,51	80,28
PG2	<i>Alphitonia neocaledonica</i>	1,5	0,86	2,15	82,43
PG2	<i>Baumea deplanchei</i>	1,44	0,78	2,06	84,49
PG2	<i>Soulamea pancheri</i>	1,27	0,63	1,82	86,31
PG2	<i>Styphelia cymbulae</i>	1,24	0,7	1,78	88,09
PG2	<i>Schoenus neocaledonicus</i>	1,14	0,55	1,63	89,72
PG2	<i>Costularia pubescens</i>	1,1	0,92	1,57	91,29
PG2	<i>Solmsia callophylla</i>	0,85	0,71	1,22	92,51
PG2	<i>Costularia nervosa</i>	0,66	0,45	0,94	93,45
PG2	<i>Costularia comosa</i>	0,61	0,53	0,87	94,32
PG2	<i>Stenocarpus milnei</i>	0,6	0,52	0,86	95,19

group n° 3	Species	Average Similarity Si	Ratio Sim/SD	Contribution % Si	Cumulative contribution %
PG3	<i>Pteridium esculentum</i>	8,86	5,69	11,4	11,4
PG3	<i>Sannantha leratii</i>	6,61	6,18	8,51	19,91
PG3	<i>Dracophyllum ramosum</i>	6,46	4,6	8,31	28,22
PG3	<i>Lepidosperma perteres</i>	5,79	4,52	7,45	35,67
PG3	<i>Pancheria eliptica</i>	4,94	4,31	6,36	42,03
PG3	<i>Codia montana</i>	4,78	2,38	6,15	48,18
PG3	<i>Costularia pubescens</i>	4,65	4,04	5,98	54,15
PG3	<i>Styphelia pancheri</i>	4,27	3,65	5,49	59,65
PG3	<i>Stenocarpus umbelliferus</i>	4,17	2,81	5,37	65,02
PG3	<i>Mousse</i>	3,73	2,19	4,8	69,82
PG3	<i>Montrouzieria sphaeroidea</i>	3,6	1,66	4,63	74,44
PG3	<i>Grevillea exul rubiginosa</i>	3,54	2,18	4,56	79
PG3	<i>Cassytha filiformis</i>	3,1	2,21	3,99	82,99
PG3	<i>Peripterygia marginata</i>	2,73	1,31	3,51	86,5
PG3	<i>Styphelia cymbulae</i>	2,71	1,57	3,49	89,99
PG3	<i>Scaevola beckii</i>	2,57	1,29	3,3	93,29
PG3	<i>Codia discolor</i>	1,45	0,63	1,87	95,16

group n° 4	Species	Average Similarity Si	Ratio Sim/SD	Contribution % Si	Cumulative contribution %
PG4	<i>Lepidosperma perteres</i>	3,29	4,58	6,23	6,23
PG4	<i>Codia montana</i>	2,61	2,19	4,95	11,18
PG4	<i>Hibbertia lucens</i>	2,59	1,63	4,91	16,09
PG4	<i>Baumea deplanchei</i>	2,52	2,58	4,78	20,87
PG4	<i>Austrobuxus carunculatus</i>	2,47	2,19	4,67	25,55
PG4	<i>Smilax neocaledonica</i>	2,46	2,7	4,67	30,22
PG4	<i>Phyllanthus aeneus</i>	2,12	1,88	4,02	34,24
PG4	<i>Pteridium esculentum</i>	2,09	1,38	3,97	38,2
PG4	<i>Soulamea pancheri</i>	2,02	2,12	3,84	42,04
PG4	<i>Alphitonia neocaledonica</i>	1,97	1,61	3,74	45,78
PG4	<i>Geniostoma sp. (forêt)</i>	1,87	1,46	3,54	49,32
PG4	<i>Wikstroemia indica</i>	1,54	1,27	2,91	52,23
PG4	<i>Garcinia sp.</i>	1,42	0,87	2,68	54,91
PG4	<i>Phyllanthus balanseanus</i>	1,26	1,09	2,39	57,3
PG4	<i>Cloezia artensis</i>	1,24	0,94	2,35	59,65
PG4	<i>Stortocalyx pancheri</i>	1,18	0,72	2,24	61,89
PG4	<i>Melodinus sp.</i>	1,1	0,9	2,09	63,98
PG4	<i>Costularia arundinacea</i>	1,08	0,83	2,04	66,02
PG4	<i>Styphelia pancheri</i>	0,97	0,89	1,83	67,86
PG4	<i>Grevillea gillivrayi</i>	0,93	0,79	1,77	69,63
PG4	<i>Eugenia sp.</i>	0,93	0,79	1,77	71,4
PG4	<i>Pancheria alaternoides</i>	0,89	0,72	1,69	73,08
PG4	<i>Geissois prunosa</i>	0,88	0,68	1,67	74,75
PG4	<i>Hibbertia vieillardii</i>	0,8	0,69	1,51	76,27
PG4	<i>Stereocarium rubiginosum</i>	0,77	0,62	1,47	77,73
PG4	<i>Styphelia cymbulae</i>	0,76	0,64	1,44	79,17
PG4	<i>Comptonella drupacea</i>	0,62	0,61	1,18	80,35
PG4	<i>Macaranga vieillardii</i>	0,61	0,45	1,16	81,51
PG4	<i>Casearia sylvana</i>	0,59	0,69	1,13	82,63
PG4	<i>Dracophyllum ramosum</i>	0,56	0,6	1,07	83,7
PG4	<i>Joinvillea plicata</i>	0,5	0,53	0,94	84,64
PG4	<i>Maxwellia lepidota</i>	0,46	0,39	0,86	85,51
PG4	<i>Cassytha filiformis</i>	0,44	0,45	0,83	86,34
PG4	<i>Sannantha leratii</i>	0,42	0,62	0,8	87,13
PG4	<i>Hunga rhamnoides</i>	0,42	0,33	0,79	87,93
PG4	<i>Morinda sp.</i>	0,4	0,52	0,76	88,69
PG4	<i>Osmanthus austrocaledonicus</i>	0,38	0,52	0,72	89,41
PG4	<i>Scaevola montana</i>	0,36	0,53	0,69	90,1
PG4	<i>Thiegemopanax sp.</i>	0,34	0,54	0,65	90,75
PG4	<i>Eugenia stricta</i>	0,34	0,38	0,64	91,39
PG4	<i>Peripterygia marginata</i>	0,33	0,44	0,63	92,03
PG4	<i>Becariella crebrifolia</i>	0,27	0,46	0,52	92,55
PG4	<i>Lygodium reticulatum</i>	0,26	0,38	0,5	93,05
PG4	<i>Ixora collina</i>	0,26	0,33	0,5	93,54
PG4	<i>Flagellaria neocaledonica</i>	0,25	0,37	0,47	94,01
PG4	<i>Montrouzieria sphaeroidea</i>	0,24	0,37	0,45	94,47
PG4	<i>Cupaniopsis sp.</i>	0,21	0,38	0,4	94,86
PG4	<i>Gahnia novocaledonensis</i>	0,2	0,26	0,38	95,25





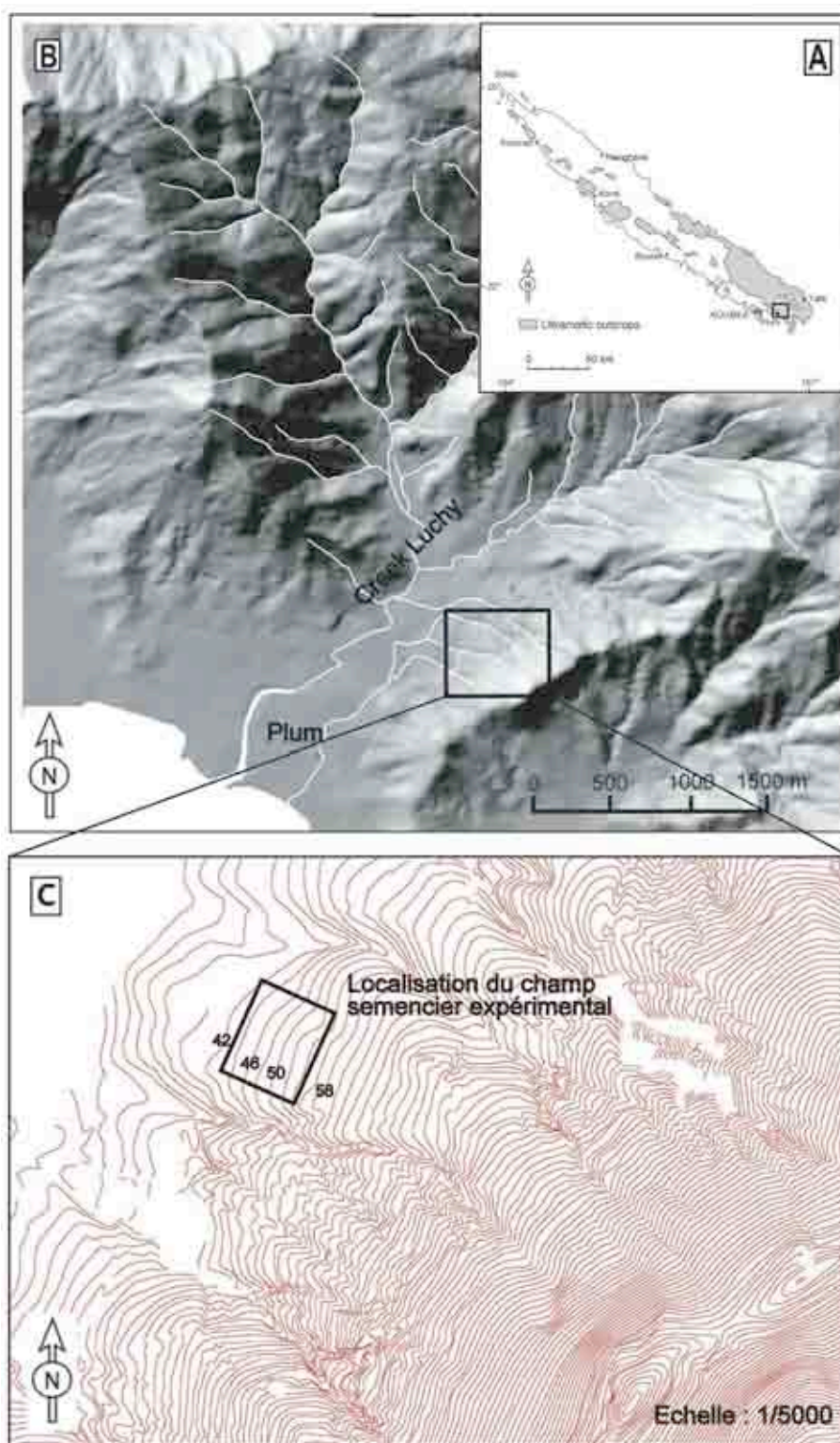
## **CHAPITRE 2. Réponses de *Costularia comosa* (Cyperaceae) aux fertilisations azotées et phosphatées : effets sur la croissance et le développement des plantes cultivées en plein champ dans des sols ferrallitiques de Nouvelle-Calédonie**

## 2.1. Introduction

Le problème crucial concernant les techniques de revégétalisation est l'approvisionnement en semences natives des milieux miniers qui sont encore peu commercialisées. Actuellement, des collectes de graines sont organisées sur les différents massifs miniers du territoire, afin de permettre la production de plants destinés aux travaux de restauration par plantation et de permettre la réalisation des travaux par semis hydrauliques. Ces collectes, très aléatoires (date de récoltes variables, quantité et qualité imprévisibles), se font sur sites naturels non aménagés, par les membres de tribus regroupés en association. Ces collectes ne permettent de disposer que de quantités de graines bien inférieures aux besoins de la revégétalisation et à un prix de revient très élevé (environ 40% du coût total du semis hydraulique). Ce souci d'approvisionnement risque de devenir encore plus pressant dans un futur très proche, les opérateurs miniers et les surfaces exploitées vont s'étendre en Province sud comme en Province nord de la Nouvelle-Calédonie.

La réalisation de champs semenciers apparaît comme la solution privilégiée par l'ensemble des acteurs néo-calédoniens de la revégétalisation des sites miniers. Cependant aucune plante endémique aux sols ultramafiques calédoniens n'ayant été cultivée en plein champ, il est nécessaire de déterminer au préalable les conditions culturales optimales pour leur croissance, leur fructification et le savoir faire relatif aux pratiques de culture les mieux adaptées. Ainsi la société SIRAS Pacifique, en partenariat avec l'Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC) et l'aide financière de la Province Sud et de l'Union Européenne (programme SYSMIN, 8<sup>e</sup> FED) a mis en place un champ semencier expérimental sur la commune de Plum en Province Sud. Dans ce cadre partenarial, j'ai été chargé de piloter sa mise en place et son suivi.

L'étude exposée ici a pour objectif l'établissement d'un premier référentiel, tant pédologique qu'agronomique, sur la culture en plein champ de *Costularia comosa* sur des sols ferrallitiques colluvionnés de Nouvelle-Calédonie. En effet, à la différence des essais agronomiques réalisés précédemment sur ces sols (Edighoffer 1993), les plantes cultivées ici sont endémiques et adaptées aux fortes carences en azote et phosphore de ces environnements ultramafiques. L'espèce *Costularia comosa* caractérisée comme pionnière des terrains miniers dégradés et à large répartition géographique a été retenue pour cette expérimentation. Celle-ci est inspirée des essais agronomiques pratiqués avec des espèces de graminées sur sol



**Figure 2.1.** (A) Carte montrant les surfaces occupées par les roches ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (en gris) avec la localisation du site d'étude. (B) Carte des reliefs du bassin versant étudié dans le massif ultramafique du Sud, avec la localisation de l'essai sur le bassin versant. (C) Situation topographique du champ semencier sur le site d'étude

arable (Black 1993 ; Christian et al. 1981 ; Dagnélie 2008 ; Greenwood 1981). Cette expérimentation consiste à identifier les effets de différentes doses de fertilisants azotés et phosphatés sur le développement, de la croissance au rendements, et sur l'intensité de mycorhization de *Costularia comosa*. Ces travaux de fertilisation en azote (N) et en phosphore (P), principaux nutriments limitant la croissance des plantes sur les sols ultramafiques, contribueront à estimer l'évolution de ces deux éléments apportés au sol et à évaluer les teneurs en nutriments dans les plantes cultivées. Chez ces Cyperaceae pour lesquelles on vient à peine de découvrir la présence de structures mycorhiziennes à faible affinité avec la plante, le rôle de ces structures sur la croissance des plantes est encore incertain. Les faibles connaissances scientifiques disponibles sur les mécanismes de nutrition des Cyperaceae nous mènent à évaluer la relation entre la mycorhization et la croissance en milieu enrichi en éléments essentiels.

## **2.2. Matériel et méthodes**

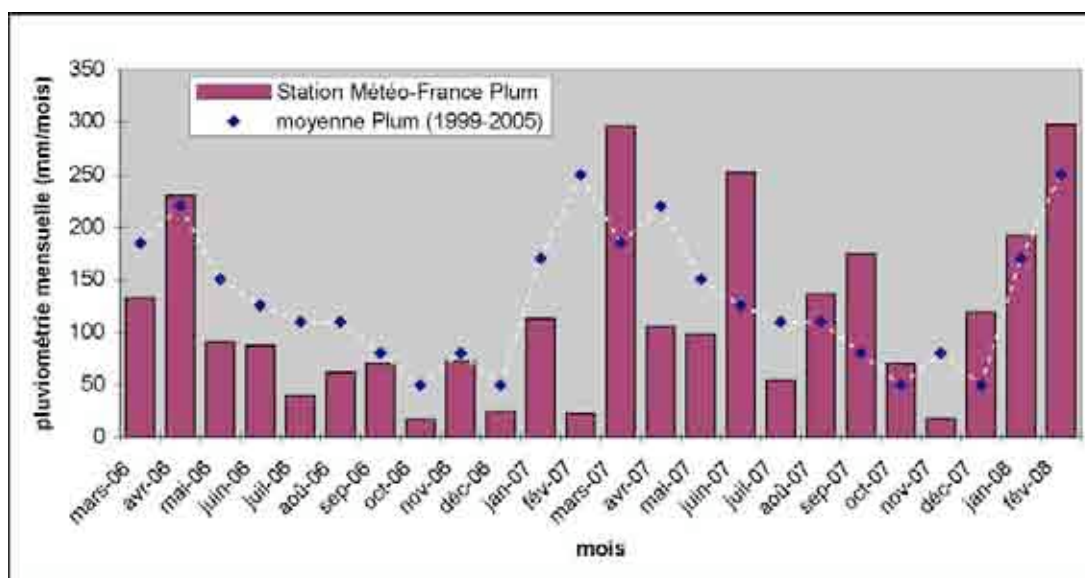
### **2.2.1. Présentation du site d'étude**

#### **2.2.1.1. Localisation et caractérisation du bassin versant**

Il se situe sur la commune de Plum (22°15'S, 166°36'E), au sud-ouest de la Grande-Terre calédonienne, à environ 27 km au sud-est de Nouméa (Fig 2.1). Située en bordure orientale du Mont-Dore (22°16'159" Sud ; 166°38'403" Est), cette zone fait partie du grand massif du Sud, composé de harzburgites plus ou moins serpentinisées et de serpentinites (Noesmoen et Millon 1971). Le champ fait partie d'un bassin versant creusé par une rivière permanente (creek Lucky) s'écoulant du Nord vers le Sud, et par une série de ruisseaux temporaires, n'apparaissant que lors des épisodes de fortes pluies. Ces dernières sont responsables du vallonnement des versants marqués par de nombreux talwegs qui se prolongent jusqu'à la zone de piémont (Fig 2.1). Des plateaux reliques dominent le bassin à l'Est. Les processus géomorphologiques dominant dans la zone de piémont et des versants sont le colluvionnement et l'alluvionnement marqués par une érosion importante en amont des pentes (Trescases 1975). L'accumulation colluviale reste faible même en bas de pente. En amont de la parcelle, la couverture pédologique est squelettique, des blocs

de roches non enracinés parsèment la surface du sol. Ce n'est que vers l'aval que la couverture pédologique s'approfondit, sans toutefois dépasser le mètre.

Il existe une très forte variation des précipitations au cours de l'année entre la saison sèche (de septembre à novembre) et la saison humide (de janvier à avril), mais également des variations annuelles importantes (Fig 2.2). Cette zone reçoit des précipitations totales moyennes de l'ordre de 1515 mm par an, (moyenne sur 10 ans, station Météo-France Plum) avec en moyenne 332 mm pour le mois le plus humide (février) et 64 mm pour le mois le plus sec (octobre).

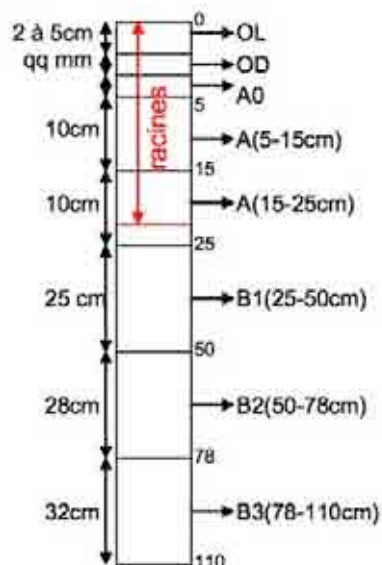


**Figure 2.2.** Précipitations moyennes mensuelles mesurées à la station Météo-France de Plum entre mars 2006 et février 2008 (Météo-France, Nouméa)

### 2.2.1.2. Description du site avant la mise en place du champ ( $t_0$ )

#### Type de sol

Les sols de la parcelle du champ semencier, issus de l'altération de la roche péridotitique, sont définis par les pédologues comme ferralitiques ferritiques colluviaux (Latham 1985). Le profil pédologique avant exploitation agricole est représenté sur la figure 2.3. En ce qui concerne la granulométrie, la partie superficielle du sol (ou top-soil) est composée principalement de sables moyen grossiers à moyens (40% en moyenne), avec une proportion faible de sables fins (25% en moyenne). La proportion de sable grossier diminue avec la profondeur tandis que celle de la fraction limono-argileuse augmente.



OL (1-5 cm) : Horizon de litière

OD : Horizon de décomposition, peu de matières organiques humifiées. 3-5 mm de matière organique.

A0 : Sol rouge-brun foncé. Échantillon contenant une quantité notable de matières organiques, représentée par des agrégats noirâtres plus ou moins décomposés.

A (5-15 cm) : Sol rouge-brun. Zone racinaire avec un horizon cohérent et une agrégation développée et compacte. Présence de vieilles racines en décomposition.

A (15-25 cm) : Sol de couleur plus brune. Deuxième zone de sol rhizosphérique, avec un chevelu racinaire plus fin et plus développé. La structure du sol est moins cohérente et très meuble. Le sol est compact, mais la présence de pisolites permet une aération.

B1 (25-50) : Sol, de couleur marron claire avec des domaines plus noirs, est compact et a une texture argileuse. Le matériel est fin (limon et argile). L'infiltration de l'eau est moins importante dans cette zone, du fait d'une faible perméabilité.

**Figure 2.3.** Description du profil pédologique type avant la mise en place du champ semencier. Les sols de la parcelle issus de roches péridotitiques sont définis par les pédologues comme des sols ferrallitiques ferritiques colluviaux

Les résultats des analyses chimiques obtenus à l'ICP-OES (IRD, LAMA) sur les échantillons du sol avant perturbations, montrent la forte teneur de ces sols en métaux (34 à 47 % de fer ; 3,8 à 5,8 % d'aluminium ; 3,3 à 5,2 % de chrome ; 0,4 à 1,7 % de manganèse ; 0,4 à 0,7 % de nickel) (Annexe 2.1). Le sol est également assez riche en silicium (0,2 à 7,6%). On note une certaine variabilité au niveau des différents échantillons analysés. Ceci peut s'expliquer par la position de l'échantillon sur la toposéquence de la parcelle de culture correspondant aux sols du groupe chimique 3 (CG3) du chapitre précédent (Lagrange et al. 2009b). En effet, une pente plus importante induit des conditions de drainage supérieures et une lixiviation accrue des éléments en fonction de leurs mobilités. Les éléments chrome, nickel et manganèse, présents en quantité non négligeable dans les échantillons de sol, sont réputés pour leur phytotoxicité à des seuils qui varient selon l'élément et la plante considérés (Jaffré 1980 ; Brooks 1987). Par ailleurs, nous avons montré que la quantité phytodisponible (concentration en éléments solubilisés dans les extraits DTPA) de ces éléments métalliques était limitée par rapport aux quantités totales

présentes dans les sols, mais que en réalité ces quantités restent très élevées par rapport aux sols non-ultramafiques et potentiellement phytotoxiques (cf. chapitre 1).

Les teneurs en nutriments du sol sont faibles (N : 1,5 g/kg ; P : 130 mg/kg ; K : 140 mg/kg ; Mg : 15mg/kg ; Ca : 1,9 mg/kg). Le rapport C/N moyen des échantillons du sol est assez élevé (~19) indiquant une décomposition lente de la matière organique dans le sol de surface. Les quantités de phosphore total (~130 mg/kg) et de phosphore assimilable (< 5 mg/kg) des sols sont faibles pour une bonne nutrition des plantes. Le rapport Ca/Mg déséquilibré (0,18) est également défavorable à la nutrition des plantes.

### Description du couvert végétal

Avant la mise en place du champ, le faciès de végétation était de type maquis ligno-herbacé à *Codia discolor* (Jaffré 1980) correspondant au groupe phytosociologique 3 (PG3) dans le chapitre précédent. Cette formation végétale résulte de la destruction d'une végétation plus haute par des incendies répétés (Jaffré et al. 1998). Il s'agit d'un faciès principalement composé de végétaux buissonnants sclérophylles et héliophytes, associés à des herbacées de la famille des Cyperaceae. Cette formation végétale est parfaitement adaptée aux conditions pédoclimatiques extrêmes du milieu où elle se développe.

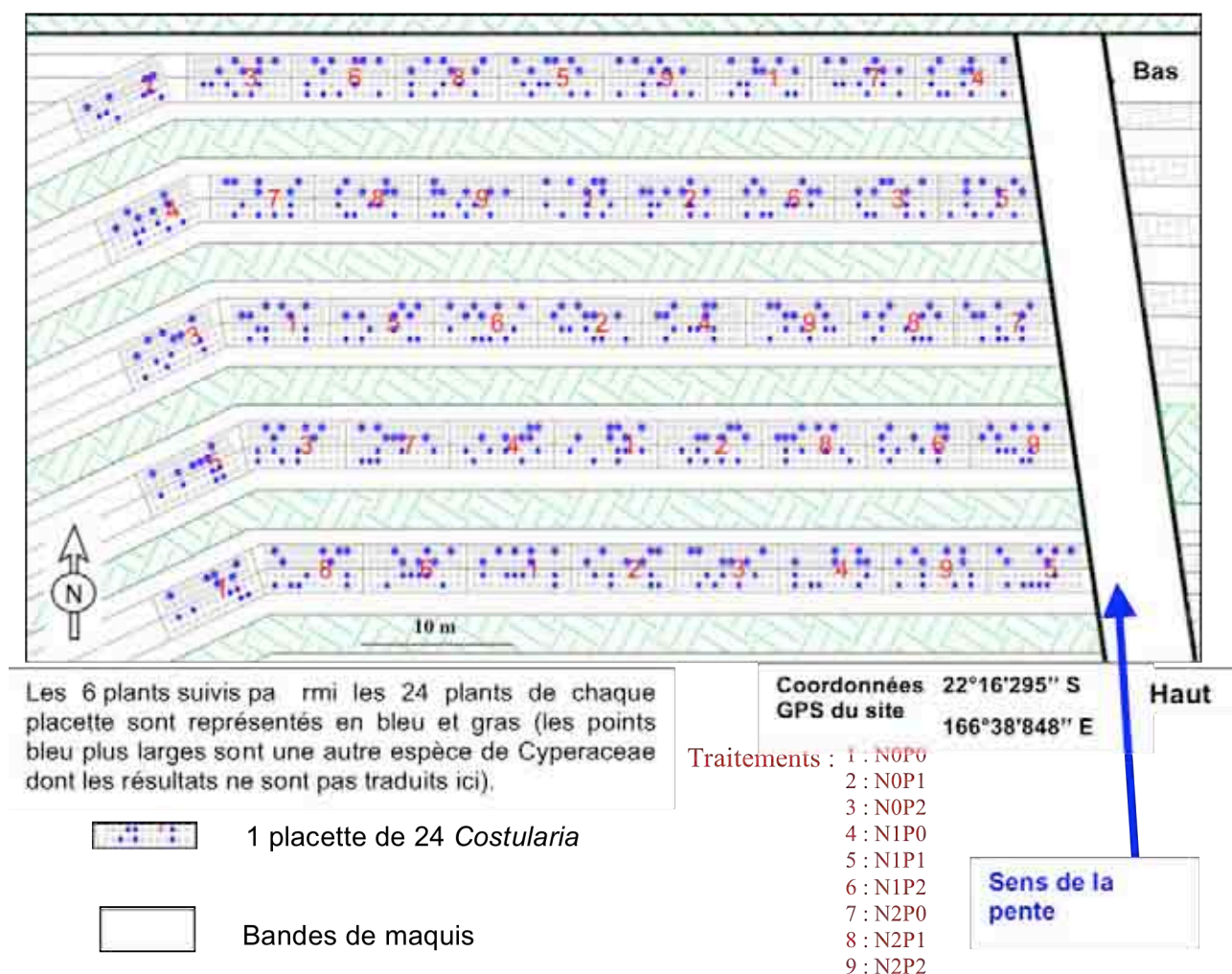
Les plantes de la famille des Cyperaceae, seules herbacées rencontrées dans le maquis minier, ont un rôle essentiel dans la stabilisation du sol grâce à leur système racinaire dense et ramifié. Étant donné leur caractère herbacé et pionnier, le cycle de développement de ces Cyperaceae est plus rapide que celui des autres végétaux ligneux du maquis. L'espèce étudiée, *Costularia comosa* est présente dans la végétation initiale du site d'étude et le genre *Costularia* fait partie du genre herbacé pionnier le plus répandu au sein des maquis néo-calédoniens. Cette espèce est adaptée à une large gamme de milieux sur terrain minier (sols hypermagnésiens et sols ferrallitiques) et d'altitude (0 à 1000 m) (Jaffré et Pelletier 1992). Elle colonise principalement les sols meubles, en zones ouvertes.

### 2.2.2. Description du plan expérimental

Le terme de **parcelle**, utilisé par la suite, regroupe l'ensemble du champ expérimental. La parcelle est structurée en **blocs (ou lignes)** : bloc représente une zone de plantation considérée comme homogène et délimitée par des bandes de



végétation naturelle (maquis). Au sein de chaque bloc, toutes les combinaisons des facteurs étudiés sont présentes et disposées de manière aléatoire dans des **placettes**. Une placette est ainsi une unité expérimentale regroupant une combinaison unique des facteurs testés appelée traitement (Fig 2.4).



**Figure 2.4.** Schéma de la parcelle expérimentale avec la répartition aléatoire des 45 placettes et des 270 plants de *Costularia* suivis de l'essai de fertilisation

### 2.2.2.1. Plan expérimental

Cet essai en blocs complets aléatoires est un plan expérimental classiquement utilisé pour les essais agronomiques permettant de prendre en compte l'hétérogénéité de l'ensemble de la parcelle expérimentale lors du traitement statistique des données (Dagnélie 2003). Plus il y a de blocs, plus la variance sera

stable, plus la précision des analyses statistiques sera élevée. Afin d'avoir une stabilité acceptable de la variance, nous avons retenu pour cette étude 5 blocs contenant chacun 9 placettes. La longueur des blocs est disposée perpendiculairement à la pente, principale source d'hétérogénéité au sein de la parcelle. Le sol est donc considéré comme étant homogène à l'intérieur de chaque bloc et hétérogène entre les blocs.

Au sein de chaque bloc, à chacune des neuf placettes est attribué de façon aléatoire, un des neufs traitements de fertilisation (azote et phosphore) décrits ci-après (Fig 2.4). Au sein de chaque placette, les plants sont répartis sur deux lignes de plantation espacées d'un mètre (Fig 2.5). Chacune des placettes relatives à un traitement donné contient 24 individus espacés de 50 cm (soit une placette = 12 m<sup>2</sup>). Les différents blocs sont séparés par des bandes de végétation de 2,5 m de large (maquis minier initial) afin de limiter au mieux la lixiviation et le mélange des intrants entre les blocs dus au ruissellement naturel (Fig 2.5).



**Figure 2.5.** Photographie d'une placette de l'essai en blocs aléatoires complets

#### 2.2.2.2. Description des différents traitements de fertilisation

Chaque traitement de fertilisation (numéroté de 1 à 9) est une combinaison d'une dose d'azote et d'une dose de phosphore.

- Le fertilisant **azoté** utilisé est l' « AZOLON 38 N Medium », un engrais à libération progressive (12 mois sous l'effet des températures et de l'humidité) à base d'urée-formaldéhyde. Il contient 38% d'N total, (2% d'N sous forme de carbamide et 36 % sous forme d'urée-méthylène). Trois doses d'azote ont été définies :

N<sub>0</sub> : pas d'N

N<sub>1</sub> : 100 kg d'N par ha

N<sub>2</sub> : 500 kg d'N par ha

- Le **phosphore** est apporté sous forme de superphosphate triple (N = 0%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = 48%, K<sub>2</sub>O = 0%). Trois doses ont été définies :

P<sub>0</sub> : pas de P

P<sub>1</sub> : 100 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> par ha, soit 43,6 kg de P par ha

P<sub>2</sub> : 500 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> par ha, soit 218 kg de P par ha

Par ailleurs, une fertilisation **potassique** sous forme de sulfate de potassium (K<sub>2</sub>O = 50%) a été apportée systématiquement à raison de 200 kg de K<sub>2</sub>O par ha, afin que le potassium ne soit pas un facteur limitant, et qu'ainsi l'effet croisé de la fertilisation azotée et phosphatée soit optimal et non pas biaisé par un manque de potassium.

Nous avons donc deux variables combinées avec chacune trois niveaux de concentration ce qui conduit à neuf traitements (N0P0, N1P0, N2P0, N1P0, N1P1, N1P2, N2P0, N2P1, N2P2), disposés par tirage aléatoirement sur chacun des cinq blocs (Fig. 2.4).

### 2.2.2.3. Mise en place du champ expérimental

Dans un premier temps, la parcelle a été défrichée, en prenant soin de conserver les bandes intercalaires séparant les blocs. Puis elle a été sous-solée à l'aide d'une griffe (40 cm de profondeur), afin d'en extraire le maximum de souches, de racines et de blocs rocheux. Le sol a ensuite été travaillé par passage d'un cover-crop sur 20 cm de profondeur le long des bandes défrichées. Les engrais ont ensuite été disposés en respectant le plan d'expérimentation à l'aide d'un épandeur manuel. Un nouveau passage de cover-crop a été effectué afin de les enfouir dans la couche superficielle du sol sur environ 20 cm. Un système d'irrigation a été mis en place pour homogénéiser l'arrosage et soutenir le développement des plants. Il consiste en un réseau de goutte-à-goutte contrôlé par des électrovannes. Ce système automatique délivre 0,5 L d'eau par jour à chaque plant, excepté lorsqu'il pleut. Ensuite, les plants de *Costularia comosa* produits en pépinière et âgés de douze à quatorze mois, ont été plantés en avril 2006 : 24 plants par placette x 5 répétitions x 9 traitements = 1080 plants.

## 2.2.3. Acquisition des données

### 2.2.3.1. Méthodes de suivi

• Les données relatives à la croissance ont été relevées sur un quart des plants plantés, soit 6 plants par placette, répartis comme représenté sur la figure 2.4. Le nombre de plants suivis correspond donc à 6 plants x 5 répétitions = 30 plants suivis par traitement, x 9 traitements = 270 plants. Il s'agissait de mesurer les caractères suivants :

- La hauteur au sol de la plus longue feuille
- Le plus grand diamètre de la plante
- Le nombre de talles<sup>1</sup> par plant
- Le nombre de hampes florales par plant

Ces mesures ont débuté 6 mois après la plantation afin de sélectionner de façon homogène la taille des plants suivis. Elles ont été réalisées tous les deux mois entre octobre 2006 et février 2008 afin de calculer les taux de croissance par unité de temps des plants selon le traitement de fertilisation.

• Le suivi du développement et des stades phénologiques a été réalisé sur les mêmes individus et à la même fréquence que les mesures de croissance. Ce suivi a consisté à relever la période d'initiation des hampes florales, le nombre d'individus portants des fleurs immatures, ouvertes ou fanées et des fruits immatures, matures ou dispersés au sol.

• Afin de suivre le contenu des sols en C, N et P totaux et assimilables au cours de l'expérience, des prélèvements de sol non-rhizosphérique (au centre de la parcelle dans la zone non cultivée) ont été réalisés à  $t_0$  (mars 2006, avant mise en place du champ),  $t_1$  (avril 2006, juste après fertilisation),  $t_2$  (août 2007) et  $t_3$  (février 2008). À  $t_3$ , en fin d'expérimentation, les sols rhizosphériques des plants échantillonnés et non-rhizosphériques ont été prélevés et analysés. L'échantillonnage des sols a été fait à l'aide d'une tarière de 5 cm de diamètre et sur 20 cm de profondeur. Trois prélèvements à différents endroits de la placette ont été réalisés et homogénéisés afin d'avoir des résultats représentatifs de la placette. Les sols rhizosphériques,

---

<sup>1</sup> Talle : tige adventive naissant à la base de la tige principale de certaines graminées ; ou définition plus ancienne : tige d'une plante garnie de ses feuilles. Par extension, on parlera ici de talle pour *Costularia comosa* pour décrire les touffes foliaires secondaires qui peuvent être très nombreuses (les hampes florales ou fructifères étant comptées à part).

quant à eux, ont été échantillonnés lors du prélèvement des 3 plants par placette en fin d'expérimentation et homogénéisés de la même manière. Les analyses chimiques des concentrations en C, N, P totaux, P assimilable,  $\text{NH}_4$  et  $\text{NO}_3$  dans les sols ont été réalisées au Laboratoire des Moyens Analytiques de l'IRD Nouméa (LAMA).

#### **2.2.3.2. Méthodes d'évaluation des effets de la fertilisation sur les teneurs en éléments, les rendements en graines et les fréquences de mycorhization de *C. comosa***

- Deux ans après la plantation, à la fin de l'expérimentation (mai 2008), les parties aériennes et racinaires de trois plants par placette sont prélevées. Ces trois plants sont choisis dans la moyenne de croissance déterminée à partir des six plants suivis et mesurés. Dans un premier temps, les racines, les feuilles et les hampes sont lavées plusieurs fois séparément à l'eau distillée, afin de les débarrasser des particules de sol présentes à leur surface, puis elles sont séchées et pesées pour obtenir des données de biomasse de matière sèche. Dans un second temps, chaque partie des plantes est broyée afin de réaliser des analyses pour déterminer leur contenu en N, P, K, Mg et Ni par ICP-OES.
- En décembre 2007, à la maturité des fruits, les données relatives à la fructification sont relevées sur les 18 plants restant au sein de chaque placette (24 moins 6 sur lesquels les mesures précédentes n'ont pas été réalisées). Les caractères mesurés pour chaque placette sont :
  - Le nombre de hampes florales par plant
  - Le poids de graines par placette
  - Le nombre de graines par gramme de matière après séparation des graines de la hampe
  - Le poids de 100 graines par placette
  - Le taux de germination de 100 graines par placette

À partir de la mesure du poids de graines récoltées par placette et du nombre de graines par gramme de matière, on peut estimer le nombre de graines par placette et par plant. Il est ainsi établi un rendement de fructification selon les traitements de fertilisation.

Des mesures supplémentaires du nombre de hampes ont été réalisées en décembre 2008 sur les 18 individus restants au sein de chaque placette.

• L'estimation du taux de colonisation par les champignons symbiotiques endomycorhiziens est réalisée chez *Costularia comosa* au temps  $t_3$  en fin d'expérimentation. Dans un premier temps, un échantillonnage de tous les traitements a été réalisé. Les résultats obtenus en termes de mycorhization ont montré peu de différences entre les doses P1 et P2, et N1 et N2. C'est pourquoi l'analyse finale complète de la mycorhization n'est effectuée que sur les plants suivis des placettes ayant reçues les traitements de fertilisation N0P0, N0P2, N2P0 et N2P2. Pour cela, une dizaine de fragments (1 cm environ) de racines fines ont été prélevés à différents endroits du chevelu racinaire de chaque plant échantillonné. Ils sont ensuite traités suivant le protocole de Koske et Gemma (1989) : les fragments sont placés 10 minutes à l'autoclave en présence de KOH, rincés à l'eau distillée, puis traités avec quelques gouttes d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) afin de les décolorer, rincés de nouveau, puis colorés au bleu Trypan (3 à 5 minutes à l'autoclave, puis rincé). Les fragments de racines sont ensuite montés entre lame et lamelle dans une goutte d'eau glycinée (10%) et observés au microscope optique afin d'estimer la fréquence (F) et l'intensité (M) de la colonisation endomycorhizienne et le type des structures mycorhiziennes présentes (mycélium, vésicules, arbuscules). Ces deux paramètres caractérisant la colonisation des mycorhizes à arbuscules (AM) ont été mesurés suivant la méthode de Trouvelot et al. (1986) :

$$F (\%) = (\text{nombre de fragments mycorhizés} / \text{nombre total de fragments}) \times 100$$

$$M (\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / (\text{nombre total de fragments})$$

Avec :  $n_5$  le nombre de fragments avec plus de 90% d'infection,  $n_4$  le nombre de fragments ayant entre 50 et 90% d'infection,  $n_3$  entre 10 et 50% d'infection,  $n_2$  entre 1 et 10% d'infection et  $n_1$  moins d'1% d'infection.

#### 2.2.4. Exploitation des données : traitements statistiques

Le but de ces essais est de déterminer s'il existe un effet significatif des différents traitements testés sur les paramètres listés précédemment. Pour cela, on effectue des analyses de variance (ANOVA) qui permettent de comparer la variance des moyennes des caractères étudiés entre les traitements. Pour chaque placette, on calcule la moyenne de chaque caractère étudié ( $m_{ij}$  = moyenne des mesures sur les  $k$  échantillons par placette pour le traitement  $i$  à la ligne  $j$ ), c'est sur ces moyennes que l'on effectue l'analyse de variance afin de s'affranchir de la variabilité intra-placette (Dagnélie 2003). Celle-ci contribuerait au terme résiduel de l'ANOVA,

alors qu'elle résulte uniquement de la variabilité entre individus et en aucun cas de celle attribuable au traitement. Si on note  $m_i$  la moyenne du caractère sur les cinq lignes pour le traitement  $i$  ( $m_i = (\sum_j m_{ij})/5$ ), l'hypothèse nulle ( $H_0$ ) à tester est l'égalité des moyennes des populations (l'ensemble des plants ayant subi le même traitement) dont sont extraits les échantillons (plants choisis au sein de chaque population sur lesquels ont été effectuées les mesures) soit :

$$H_0 : m_1=m_2=m_3=m_4=m_5=m_6=m_7=m_8=m_9$$

avec  $H_0$  : hypothèse nulle et  $m_1$  à  $m_9$  : les moyennes du caractère testé pour les neuf traitements.

Le système étudié dans l'essai de fertilisation est un modèle croisé mixte à trois critères de classification, avec une seule observation par combinaison de trois facteurs. Les deux facteurs de fertilisation sont fixes : la dose d'N (trois niveaux) et la dose de P (trois niveaux). Le facteur bloc (cinq niveaux) sera dans notre cas considéré fixe, étant donné que les blocs ont été disposés en tenant compte de l'hétérogénéité du terrain (perpendiculairement à la pente), et non aléatoirement. On effectue donc une ANOVA factorielle, qui nous permettra de déterminer s'il existe un effet significatif de chaque facteur sur les paramètres observés, mais aussi de voir s'il existe un effet d'interaction entre le facteur dose d'N et le facteur dose de P. Ce type d'ANOVA nous permet également de vérifier qu'il n'existe pas de biais attribuable au bloc. Si un effet significatif d'un ou plusieurs facteurs est montré, des tests post-hoc sont effectués pour déterminer quels groupes diffèrent, en utilisant le test LSD de Fischer. Le principe de ce test est semblable à celui de l'ANOVA, mais il effectue les comparaisons de groupes deux à deux. Tous les tests ont été effectués avec le logiciel STATISTICA 6.2. Le principe de l'ANOVA permet de savoir si une ou plusieurs variables dépendantes (ici, les paramètres mesurés) ont une relation linéaire avec une ou plusieurs variables indépendantes (ici, les facteurs dose d'N et dose de P). Pour pouvoir appliquer l'ANOVA, trois conditions doivent être vérifiées sur les résidus, c'est à dire sur la variance intra-groupe (obtenue après que l'analyse soit faite): I- les variances des résidus de l'ANOVA doivent être égales (homoscédasticité) ; II- les résidus de l'ANOVA doivent suivre une loi normale ; III - les résidus doivent être indépendants. On calcule ainsi : (i) la variance totale par rapport à la moyenne des mesures des 9 traitements ( $m = \sum m_i / 9$ ) ; (ii) la variance des observations autour de la moyenne du groupe de traitement identique  $m_i$  (intra-groupe). Ensuite, par différence de (i)-(ii), on obtient la variance des moyennes des

différents groupes (inter-groupes). On peut donc calculer le rapport  $F = \text{variance inter-groupe} / \text{variance intra-groupe}$  qui sera comparé à celui lu dans les tables de Fischer ( $F^*$ ). Si  $F > F^*$  alors  $H_0$  est rejetée ; il existe dans ce cas des différences significatives entre les moyennes des différents groupes, mais sans savoir entre lesquelles. Pour savoir quels groupes diffèrent, il est nécessaire de procéder à des tests post-hoc (LSD Fisher).

Les analyses de comparaisons de moyennes des paramètres de mycorhization selon les traitements de fertilisation et les analyses de corrélations entre les paramètres de mycorhization, les biomasses végétales et les quantités de phosphore du sol ont été effectuées en utilisant le logiciel de statistique Kiplot V2.0 beta 13.

## 2.3. Résultats

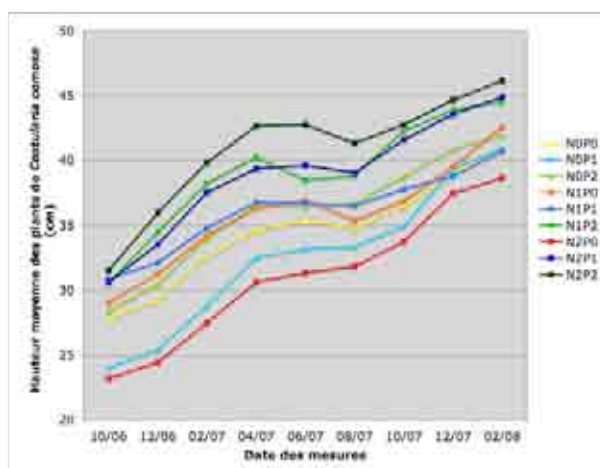
### 2.3.1. Effet de la fertilisation sur la croissance des plants de *C. comosa*

Après traitement statistique, le suivi du paramètre « diamètre des plants » n'est jamais apparu significativement différent selon les traitements. Il est donc inapproprié pour le suivi des croissances. Par contre, le paramètre "nombre de talles", ainsi que les paramètres "croissance en hauteur" et "poids de matières sèches" se sont avérés représentatifs de la croissance des plants.

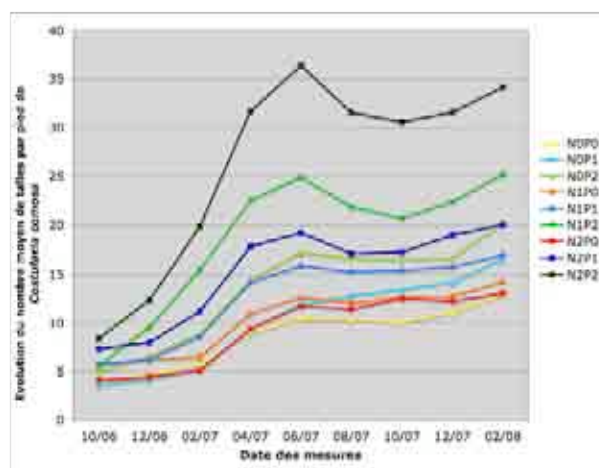
#### 2.3.1.1. Effet sur la croissance en hauteur

Il apparaît que les 3 traitements de fertilisation les plus élevés (N1P2, N2P1, N2P2) correspondent aux plus forts taux de croissance par unité de temps, Cependant, les vitesses moyennes de croissance en hauteur mesurée sur 16 mois, ne sont pas significativement différentes selon les traitements (Fig 2.6).

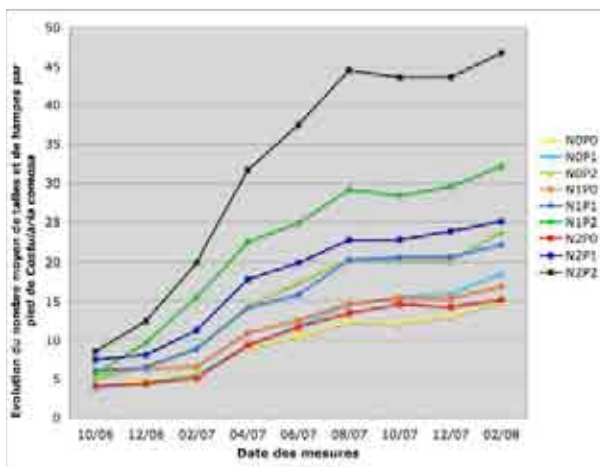




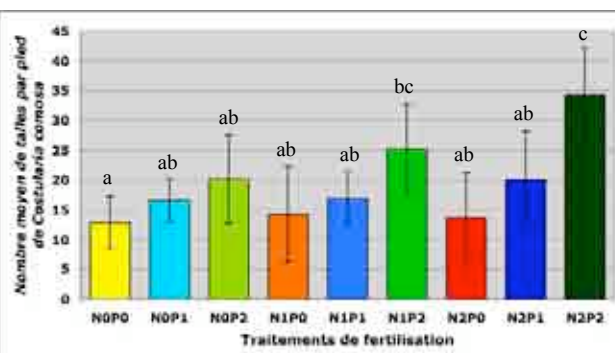
**Figure 2.6.** Croissance en hauteurs (cm) de *Costularia comosa* pendant les 16 mois de suivi de l'essai (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)



**Figure 2.7.** Évolution du nombre de talles de *Costularia comosa* pendant les 16 mois de suivi de l'essai (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)



**Figure 2.8.** Évolution du nombre de talles additionnées au nombre de hampes florales de *Costularia comosa* pendant les 16 mois de suivi (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)



**Figure 2.9.** Effet de la dose de N et P sur le nombre moyen de talles par pied de *Costularia comosa* après deux ans de croissance en plein champ

NB : Les différentes lettres, au-dessus des barres d'erreur représentant l'écart-type, indiquent les différences significatives au vu de l'ANOVA à trois facteurs (N, P, block) suivie de test Post-Hoc LSD ( $P < 0,05$ ). Moyenne sur 30 plants par groupe de traitement

Pour l'ensemble des traitements, on observe une allure semblable des courbes de croissance de *Costularia comosa*. On peut distinguer trois phases dans la croissance de ces Cyperaceae pendant la période d'étude (16 mois) :

- Une première période de croissance rapide (d'octobre à avril).
- Une période d'arrêt de croissance, correspondant à la saison hivernale (d'avril à août).
- Une reprise de croissance pendant la période chaude et humide, à partir de septembre et jusqu'à avril, analogue à la première période.

Sur l'ensemble des traitements et des placettes suivies la vitesse, moyenne de croissance de la plus longue feuille est de 0,89 ( $\pm$  0,12) cm par mois, sans différences significatives entre les traitements. Pendant la première phase (octobre 2006 à avril 2007) la vitesse de croissance est plus rapide avec en moyenne 1,32 ( $\pm$  0,24) cm par mois, alors que pendant la période hivernale (avril à août 2007), on observe un palier de croissance nulle ou même de régression apparente, probablement due au jaunissement et dessèchement de l'extrémité des feuilles.

Les analyses statistiques réalisées sur les dernières mesures effectuées en février 2008 ne révèlent aucune différence significative entre la hauteur des individus fertilisés par les neuf traitements (l'ANOVA à trois facteurs N, P, block ;  $P < 0,05$ ).

### **2.3.1.2. Effet sur la multiplication de talles**

Les courbes d'évolution du nombre de talles par pied au cours du temps indiquent également les trois phases déjà citées auparavant (Fig. 2.7) :

- D'octobre à juin : augmentation concomitante du nombre de talles par pied
- De juin à septembre : formation des hampes florales, certaines talles subissent l'organogenèse et se différencient en hampe florale. On observe alors une stagnation voire une diminution du nombre de talles par pied.
- À partir d'octobre : fin de la formation des hampes et reprise du cycle végétatif avec la formation de nouvelles talles.

Il apparaît également que les 3 traitements de fertilisation les plus élevés (N1P2, N2P1, N2P2) correspondent aux plus hauts taux de croissance par multiplication de talles en fonction du temps. Le traitement N2P2 semble très avantageux (34 talles) par rapport à N1P2 (25 talles) et à N2P1 (20 talles). Les résultats de l'ensemble des autres traitements sont compris entre 13 et 20 talles.

**Tableau 2.1.** Effet de la dose de N et de P sur les poids secs moyens des parties racinaires, aériennes et fructifères par plant de *Costularia comosa* après deux ans de croissance en plein champ

		<b>N0P0</b>	<b>N0P1</b>	<b>N0P2</b>	<b>N1P0</b>	<b>N1P1</b>	<b>N1P2</b>	<b>N2P0</b>	<b>N2P1</b>	<b>N2P2</b>
<b>Poids sec racinaire (g)</b>	<b>Moyenne</b>	6,52 a	9,35 a	12,23 a	9,74 a	11,98 a	23,79 <b>bc</b>	7,41 a	14,04 <b>ab</b>	29,65 <b>c</b>
	<b>Ecart type (+/-)</b>	3,34	4,97	6,90	7,97	5,31	10,17	4,40	4,48	12,92
<b>Poids sec foliaire (g)</b>	<b>Moyenne</b>	15,43 a	20,91 a	27,63 a	22,87 a	24,92 a	33,65 a	31,13 a	26,91 a	37,83 a
	<b>Ecart type (+/-)</b>	5,71	8,64	18,32	11,71	20,79	13,705	21,13	12,94	25,48
<b>Poids sec des hampes (g)</b>	<b>Moyenne</b>	6,00 ab	4,51 <b>a</b>	8,28 ab	7,53 ab	12,01 ab	15,9 ab	6,75 ab	15,35 ab	29,03 <b>b</b>
	<b>Ecart type (+/-)</b>	3,45	1,87	7,12	4,20	9,28	8,81	7,46	8,40	17,18
<b>Poids sec total (g)</b>	<b>Moyenne</b>	27,95 <b>a</b>	34,77 <b>a</b>	48,14 ab	40,15 <b>a</b>	48,91 ab	73,35 <b>bc</b>	45,29 ab	56,30 abc	96,51 <b>c</b>
	<b>Ecart type (+/-)</b>	8,93	14,17	31,98	18,99	28,19	25,31	31,71	21,03	49,04

NB : Les différentes lettres, à côté des données de moyennes, indiquent des différences significatives au vu de l'ANOVA à trois facteurs (dose N, dose P, bloc) suivie de test Post-Hoc LSD ( $P < 0,05$ ). Moyenne sur 15 plants par groupe de traitement (soit 3 individus par placette \* 5 lignes)

Les courbes d'évolution du nombre de talles additionnées au nombre de hampes florales ont les mêmes allures que les courbes précédentes (on retrouve les 3 phases de croissance) avec un net avantage pour le traitement N2P2 (Fig. 2.8). La comparaison du nombre de hampes entre les traitements est décrite dans le paragraphe 3.2.2.

Les analyses statistiques sur les dernières mesures réalisées en février 2008 indiquent que les individus ayant subi le traitement N2P2 et N1P2 ont un nombre de talles significativement plus élevé ( $P < 0,05$ ) que les individus du traitement témoin N0P0 (Fig. 2.9). Les individus du groupe N2P2 (34 talles) développent environ 3 fois plus de talles que ceux du groupe témoin N0P0 (12 talles). L'ANOVA réalisée sur les 9 traitements, ne montre pas de différences significatives entre les 7 autres traitements. Toutefois, il ressort une nette tendance d'augmentation du nombre de talles avec l'apport de P, tandis que l'apport de N ne semble pas avoir d'effet important en absence de P. L'apport d'azote n'a un effet qu'en présence de P (P1 et surtout P2).

### **2.3.1.3. Effet sur le poids de matière sèche des différentes parties de la plante**

Les analyses statistiques effectuées sur les valeurs moyennes des pesées des biomasses des parties aériennes (feuilles) en fonction des traitements de fertilisation n'indiquent pas de différences significatives, même si on constate des augmentations de la biomasse avec les apports de N et de P. En effet, les écarts types sont très élevés (Tableau 2.1). En revanche, les analyses statistiques effectuées sur les pesées moyennes des biomasses des racines et des hampes fructifères décèlent des différences significatives entre les traitements.

Les individus des traitements N1P2 et N2P2 ont un poids racinaire moyen ( $> 23$  g/plant) significativement supérieur à ceux des 7 autres traitements ( $< 14$  g/plant). Les individus du traitement N2P2 ont une biomasse de racine 4,5 fois supérieure au traitement N0P0 (rapport  $29,6/6,5 = 4,55$ ).

Le poids sec moyen des parties fructifères des individus fertilisés avec le traitement N2P2 (29 g/plant) est significativement plus élevé que celui des individus fertilisés avec le traitement N0P1 (4,5 g/plant), formant deux groupes distincts. Les individus fertilisés avec les 7 autres traitements ont des valeurs de biomasse des

parties fructifères intermédiaires entre les deux groupes précédents. On observe cependant un certain avantage pour les traitements N2P1, N1P2 (15 g/plant) et N2P2 (29 g/plant).

S'agissant de la biomasse totale, les individus du groupe de traitement N2P2 ont un poids de matière sèche moyen environ trois fois plus élevée que les individus témoins N0P0 (rapport  $96/28 = 3,4$ ). Les analyses statistiques, effectuées sur ces poids secs totaux moyens révèlent plusieurs différences significatives entre les traitements (Tableau 2.1). Il ressort globalement des augmentations importantes de la biomasse à la fois avec des apports de N et des apports de P, qu'ils soient pris séparément ou de manière combinée.

### **2.3.2. Effet de la fertilisation sur le cycle de développement, le rendement et la germination des graines de *C. comosa***

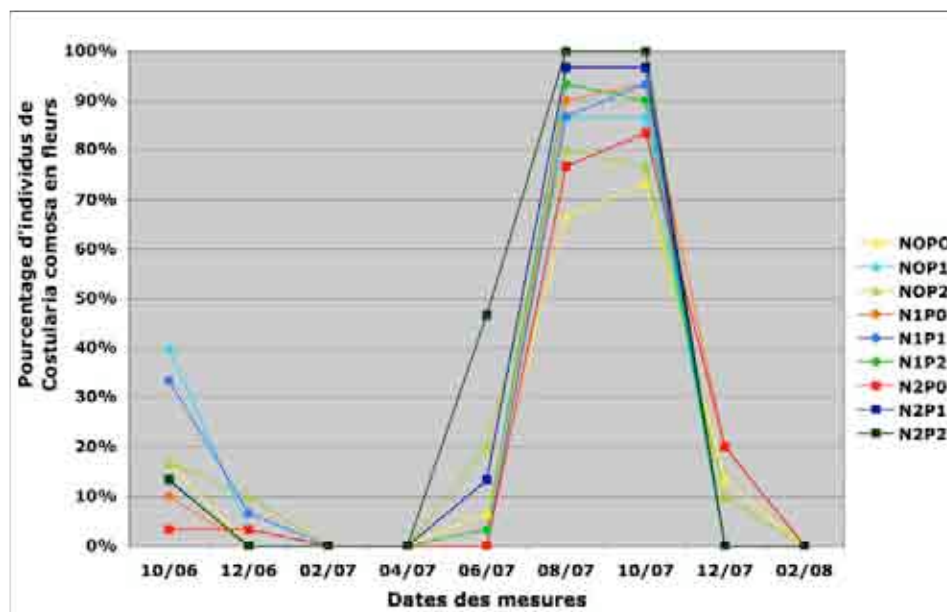
#### **2.3.2.1. Effet sur la phénologie de la floraison et de la fructification**

Depuis la transplantation des plants en plein champ en avril 2006, deux épisodes de floraison et de fructification ont été observés, avec deux pics de floraison (septembre-octobre 2006 et 2007) et deux pics de fructification (janvier-février 2007 et 2008) (Fig 2.10 et 2.11). Il apparaît que les différentes doses de fertilisants n'ont d'effet ni sur la durée et ni sur la période de floraison et de fructification de *C. comosa*. On note que la multiplication des talles s'effectue entre novembre et juin (Fig 2.7) et que le développement des hampes florales est très étalé dans le temps (Fig 2.10 et 2.11). Leur initiation débute pratiquement au moment de la sénescence des hampes de l'année précédente. La figure 2.12 résume le cycle de croissance et de développement de *Costularia comosa*.

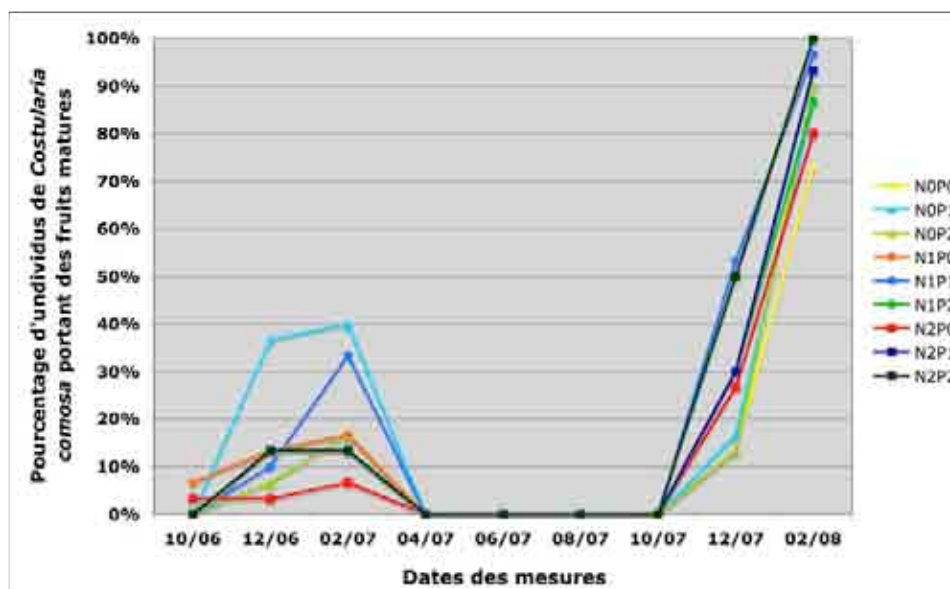
Lors du second épisode de floraison (octobre 2007), on note que 80 à 100% des individus étaient en fleurs, pour un maximum de seulement 40% lors du premier épisode. On peut donc estimer que, un an et demi après la transplantation en plein champ dans les conditions présentées précédemment, les plants de *Costularia comosa* ont acquis une maturité permettant la production de graines.

Lors du second épisode de fructification, 100% des individus présents dans les placettes ayant reçu un traitement N2P2 portent des fruits et dans une moindre mesure, N2P1 (96%), N1P1 (93%) et N1P2 (87%) ont les meilleurs résultats par rapport aux autres traitements (Fig 2.11). Dans les parcelles ayant reçu le traitement

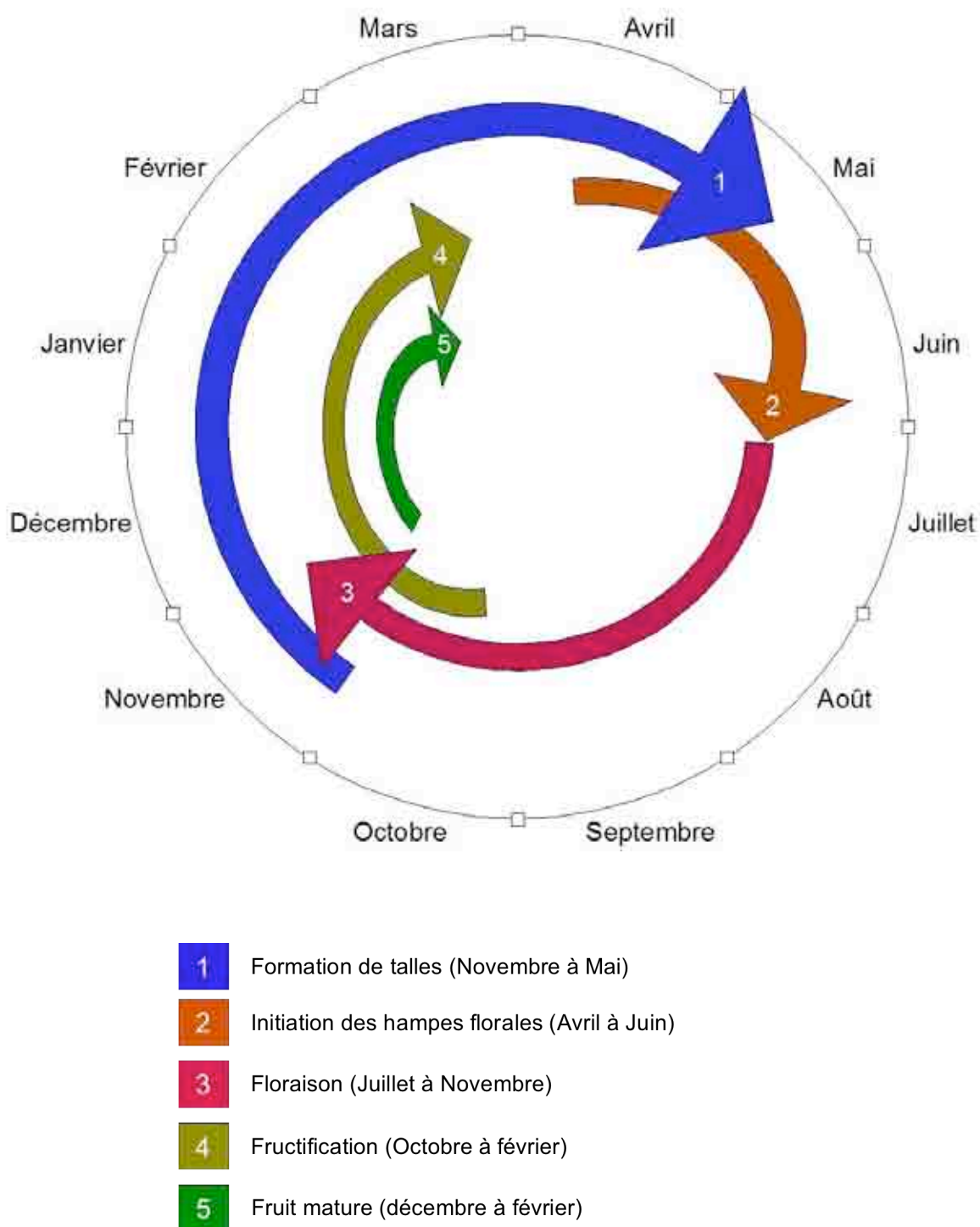
N2P2, on observe une hausse de 25% d'individus fructifères par rapport au traitement témoin N0P0.



**Figure 2.10.** Effet de la fertilisation sur la période et l'intensité de la floraison (total des fleurs en boutons et des fleurs ouvertes) chez *Costularia comosa*. (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)



**Figure 2.11.** Effet de la fertilisation sur le nombre d'individus portant des fruits matures chez *Costularia comosa*. (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)

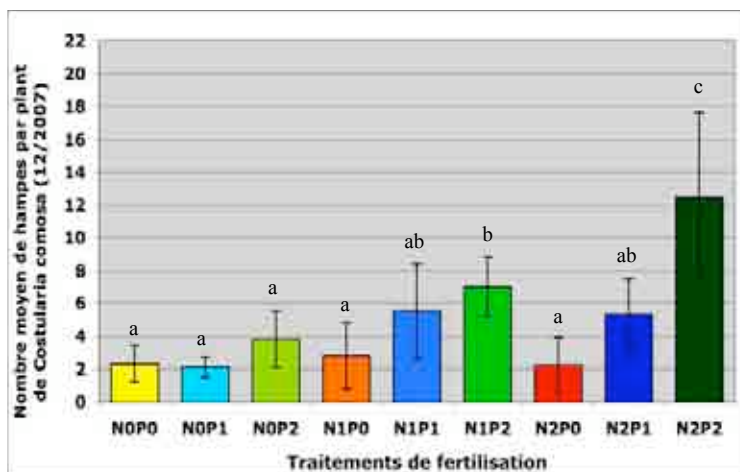


**Figure 2.12.** Schéma du cycle de croissance et de développement de l'espèce *Costularia comosa* cultivée en plein champ

### 2.3.2.2. Effet sur l'élaboration du rendement

#### 2.3.2.2.1. Nombre moyen de hampes florales par individu

Les analyses de variance (ANOVA) à trois facteurs fixes (dose de N, dose de P et bloc) effectuées sur les données du second épisode de fructification (décembre 2007) indiquent que les facteurs dose de N et dose de P ont un effet significatif sur le nombre de hampes par individu (Fig 2.13). On peut distinguer plusieurs groupes de traitement ayant des effets significativement différents sur le nombre de hampes florales. Les individus traités avec une dose d'azote nulle (N0) ou une dose de phosphore nulle (P0), correspondant au regroupement statistique (a), ont un nombre de hampes florales (< 3 hampes) significativement inférieur aux individus traités avec une dose d'azote non nulle et une dose de phosphore P2 (N1P2 et N2P2) (> 7 hampes). Les individus fertilisés avec le traitement N2P2 (groupe c) ont un nombre de hampes significativement plus élevé que les individus ayant subi tout autre traitement. Ce traitement développe en moyenne six fois plus de hampes que le traitement témoin N0P0. Les individus fertilisés avec les traitements N1P1, N2P1 (groupe ab) et N1P2 (groupe b) montrent une réponse intermédiaire entre les groupes (a) et (c).



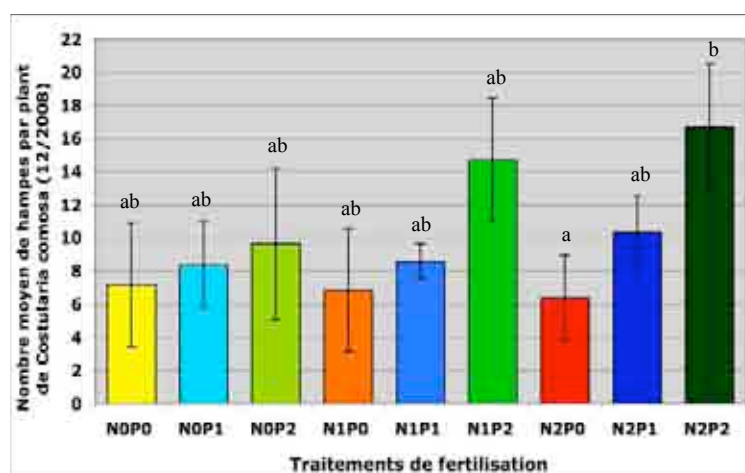
**Figure 2.13.** Effet de la fertilisation sur le nombre moyen de hampes florales par pied de *Costularia comosa* cultivé en plein champ (Mesures réalisées en **décembre 2007**, 20 mois après plantation)

NB : Les différentes lettres, au-dessus des barres d'erreur représentant l'écart type, indiquent les différences significatives au vu de l'ANOVA à trois facteurs (N, P, bloc) suivie de test Post-Hoc LSD ( $P < 0,05$ ). Moyennes sur 90 plants par groupe de traitement

Les mesures supplémentaires du nombre de hampes réalisées en décembre 2008 (3<sup>e</sup> épisode de fructification) sur les 18 individus restants au sein de chaque



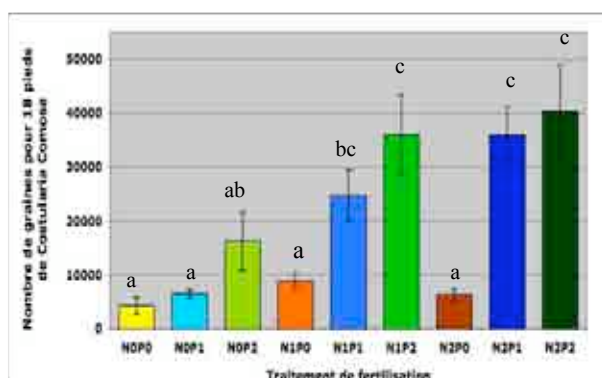
placette montrent une augmentation générale du nombre de hampes par plant par rapport à l'année précédente (décembre 2007), mais avec une conservation des effets de chaque traitement (Fig 2.14). L'analyse statistique est cependant moins discriminante. Une différence significative est toutefois obtenue entre le traitement N2P2 (> 16 hampes) et le traitement N2P0 (< 6 hampes). Bien que les autres traitements ne soient pas significativement différents, à cause d'écart-types trop élevés, les effets positifs de N et de P sur le nombre de hampes florales apparaissent nettement.



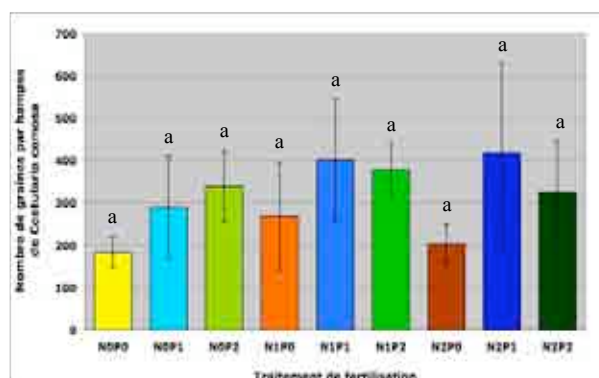
**Figure 2.14.** Effet de la fertilisation sur le nombre moyen de hampes florales par pied de *Costularia comosa* cultivé en plein champ. (Mesures réalisées en **décembre 2008**, 32 mois après plantation)

NB : Les différentes lettres, au-dessus des barres d'erreur représentant l'écart type, indiquent les différences significatives au vu de l'ANOVA à trois facteurs (N, P, bloc) suivie de test Post-Hoc LSD ( $P < 0,05$ ). Moyennes sur 90 plants par groupe de traitement

Le nombre de hampes florales par plant est en moyenne multiplié par deux entre décembre 2007 et décembre 2008 pour l'ensemble des traitements, indiquant un développement continu des plants entre décembre 2006 et décembre 2008, indépendamment des traitements.

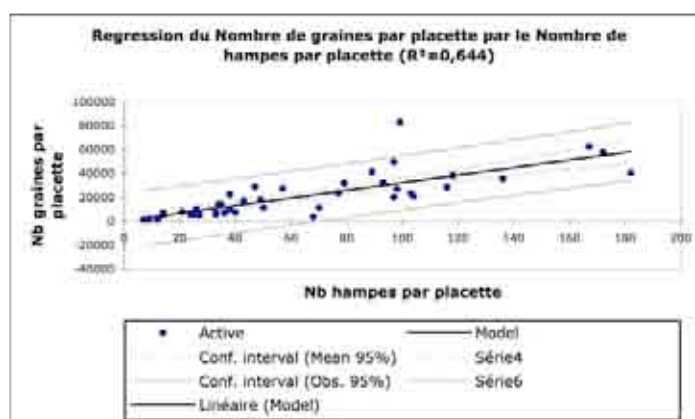


**Figure 2.16.** Nombre moyen de graines pour 18 pieds de *Costularia Comosa* selon le traitement de fertilisation (Mesures réalisées sur 90 individus en décembre 2007)



**Figure 2.15.** Nombre moyen de graines par hampes de *Costularia Comosa* selon le traitement de fertilisation (Mesures réalisées sur les récoltes de décembre 2007)

NB : Les différentes lettres, au-dessus des barres d'erreur représentant l'écart type, indiquent les différences significatives au vu de l'ANOVA à trois facteurs (N, P, bloc) suivie de test Post-Hoc LSD ( $P < 0,05$ ). Moyenne sur 90 plants par groupe de traitement



**Figure 2.17.** Régression linéaire entre le nombre de graines par placette et le nombre de hampes par placette ( $n = 45$ )

### 2.3.2.2.2. Nombre moyen de graines par hampe

Les ANOVA montrent cette fois-ci qu'il n'y a pas d'effet significatif de la dose de N et de la dose de P sur le nombre de graines par hampe de *Costularia comosa* (Fig. 2.15). On note néanmoins une tendance à l'augmentation avec les apports de N et P mais les écarts-types élevés ne permettent pas de déceler des différences.

### 2.3.2.2.3. Nombre moyen de graines par plant

Dans la perspective de la mise en place d'un champ semencier de production, le nombre de graines viables produites est le paramètre central à prendre en compte. L'effet de la fertilisation sur la production de graines au second épisode de fructification (déc. 2007) a donc été mesuré.

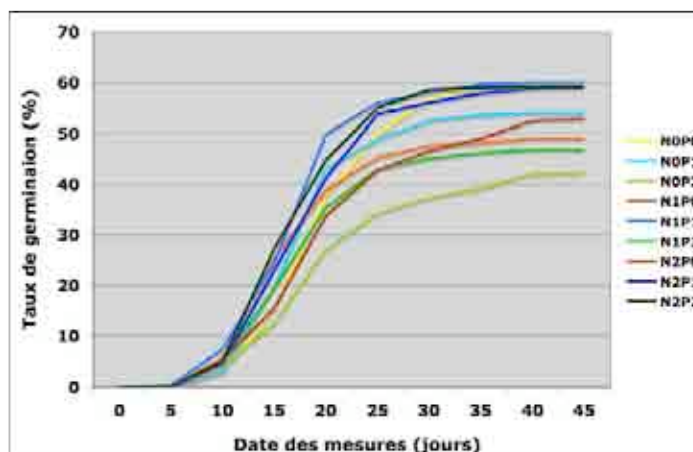
Les ANOVA montrent un effet significatif de la dose de N et de la dose de P sur le nombre de graines produites par placette (18 individus) (Fig. 2.16). Le nombre de graines produit par les 18 plants ayant subi les traitements N0P0, N0P1, N0P2, N1P0 et N2P0 (groupe a : entre 4000 et 18000 graines) est significativement plus faible ( $P < 0,05$ ) que celui des individus ayant subi les traitements N1P1, N1P2, N2P1 et N2P2 (groupe c : entre 25000 et 40000 graines). Les traitements à dose N0 ou à dose P0 donnent des nombres de graines significativement inférieurs aux autres traitements. Le groupe de traitement N0P2 et N1P1 (groupe b) est intermédiaire aux 2 autres groupes pour la production de semences. Les traitements N1P2, N2P1 et N2P2 ont donc un effet équivalent sur le nombre de graines produites. Le traitement N2P2, qui a la plus forte valeur, produit en moyen neuf fois plus de graines par individu (2270 graines) que le témoin N0P0 (250 graines).

La régression linéaire entre le nombre de graines par placette et le nombre de hampes par placette montre une corrélation (coefficient de corrélation  $R^2=0,644$  ;  $n = 45$ ) entre ces deux paramètres (Fig. 2.17). Ceci signifie qu'un individu produisant plus de hampes qu'un autre produit également plus de graines au total, avec un nombre de graines par hampe relativement homogène entre les individus.

### 2.3.2.3. Effet de la fertilisation sur la germination des graines produites

Les courbes d'évolution des taux de germination des graines de *Costularia comosa* produites dans 9 conditions de fertilisations différentes montrent des germinations se produisant entre le 5<sup>e</sup> et le 40<sup>e</sup> jour en conditions contrôlées (Température 20 °C / 30 °C sur un cycle de 12 H sans éclairage / 12 H avec

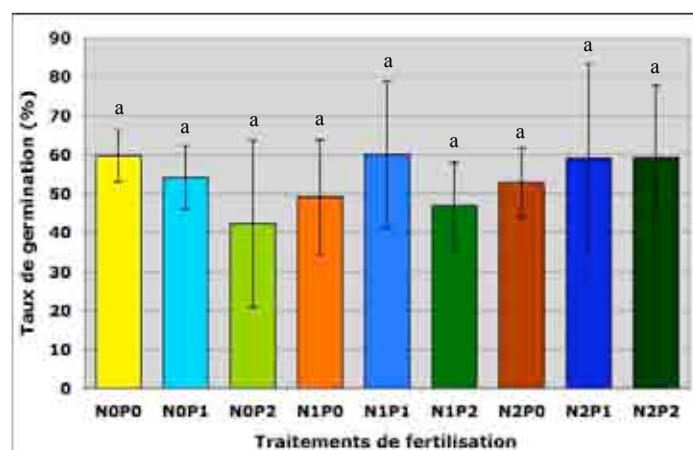
éclairage, humidité relative à saturation constante). Le maximum de germination a lieu entre le 10<sup>e</sup> et le 25<sup>e</sup> jour (Fig. 2.18). Les taux de germination s'échelonnent entre 42% et 60 % selon les traitements de fertilisation.



**Figure 2.18.** Courbes d'évolution des taux de germination des graines (%) de *Costularia comosa* produites dans 9 conditions de fertilisations différentes (22°/29°C, cycle d'éclairage 12H par 24H)

NB : Taux de germination calculés sur 500 graines par traitement de fertilisation (soit 100 graines par placette \* 5 lignes)

L'analyse statistique (ANOVA) réalisée sur les données correspondant à la dernière date de mesure des taux de germination ne permet pas de mettre en évidence de différences significatives entre les différents traitements de fertilisation (Fig. 2.19). Les traitements de fertilisation ne semblent pas avoir de rôle majeur sur la viabilité et la faculté germinative des graines produites en plein champ.



**Figure 2.19.** Effet de la fertilisation sur les taux de germination après 45 jours des graines de *Costularia comosa* produites dans les 9 conditions de fertilisations différentes

NB : Les différentes lettres, au-dessus des barres d'erreur représentant l'écart type, indiquent les différences significatives au vu de l'ANOVA à trois facteurs (N, P, bloc) suivie de test Post-Hoc LSD ( $P < 0,05$ ). Taux de germination calculés sur 500 graines par traitement de fertilisation (soit 100 graines par placette \* 5 lignes)

### 2.3.3. Effet de la fertilisation sur la nutrition minérale des plants de *Costularia comosa*

#### 2.3.3.1. Concentration en éléments dans les parties racinaire, foliaire et fructifère de la plante

Les analyses statistiques de comparaison de moyennes (tests de Kruskal-Wallis) réalisées sur les résultats indiquent que les concentrations en N, Mg, K et Ni dans les trois parties de la plante ne sont pas significativement différentes suivant les traitements de fertilisation (Tableau 2.2 et Annexe 2.2). Les mêmes tests effectués sur les teneurs en phosphore dans les hampes et dans les feuilles ne montrent pas non plus de différence significative entre les 9 traitements. Par contre, les analyses statistiques réalisées sur les teneurs en phosphore dans les racines isolent trois groupes (Tableau 2.3). Des différences significatives sont obtenues entre les trois traitements à faible valeur de phosphore (P0) et les trois traitements à forte valeur de (P2). Pour les trois traitements (P0), les concentrations en phosphore dans les racines varient entre 120 et 136 mg/kg de matière sèche alors que pour les traitements (P2) les concentrations varient de 207 à 237 mg/kg (Tableau 2.3). Les traitements à valeur de phosphore moyenne (P1) sont intermédiaires entre les deux groupes.

**Tableau 2.2.** Concentrations en azote (g/100g de matière sèche) dans les différents parties de *Costularia comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

Concentration de N dans les parties (g/100g)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	0,335 a	0,407 a	0,384 a	0,339 a	0,306 a	0,381 a	0,376 a	0,416 a	0,385 a
	Ecart type (+/-)	0,031	0,051	0,090	0,037	0,169	0,036	0,044	0,044	0,174
Foliaires	Moyenne	0,894 a	0,833 a	0,818 a	0,84 a	0,852 a	0,769 a	0,819 a	0,825 a	0,796 a
	Ecart type (+/-)	0,034	0,032	0,091	0,077	0,099	0,111	0,113	0,093	0,120
Hampes	Moyenne	0,211 a	0,230 a	0,176 a	0,214 a	0,204 a	0,244 a	0,233 a	0,236 a	0,256 a
	Ecart-type (+/-)	0,035	0,055	0,014	0,051	0,031	0,082	0,053	0,014	0,063

NB : Les différentes lettres à côté des données de moyennes indiquent les différences significatives au vu du test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)

**Tableau 2.3.** Concentrations en phosphore (mg/kg de matière sèche) dans les différentes parties de *C. comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

Concentration de P dans les parties (mg/kg)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	136 abc	185 abc	207 bc	136 ab	165 abc	226 c	120 a	177 abc	237 c
	Ecart type (+/-)	10	32	51	14	20	15	15	17	64
Foliaires	Moyenne	220 a	248 a	288 a	219 a	254 a	265 a	199 a	211 a	269 a
	Ecart type (+/-)	28	25	40	24	51	50	40	17	77
Hampes	Moyenne	33 a	53 a	43 a	37 a	33 a	71 a	40 a	33 a	76 a
	Ecart type (+/-)	16	25	18	17	21	55	22	10	28

NB : Les différentes lettres, à côté des données de moyennes, indiquent les différences significatives au vu du test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)

### 2.3.3.2. Quantité en éléments dans les parties racinaire, foliaire et fructifère de la plante

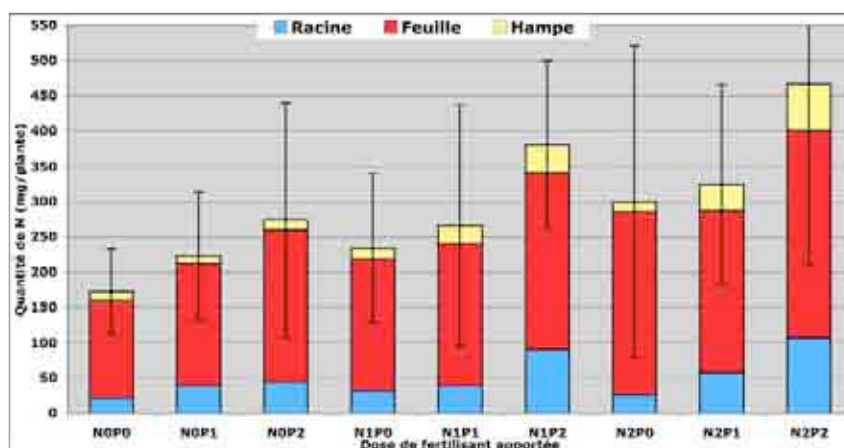
Les concentrations des cinq éléments analysés dans les différents organes de la plante rapportées aux poids de matière sèche permettent de calculer les quantités d'éléments prélevés par plante pour les neuf traitements de fertilisation (Tableaux 2.4 à 2.6 et Annexe 2.3).

S'agissant de l'azote dans les racines, les analyses statistiques mettent en évidence des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre les traitements N0P0 et N2P2. Ils mettent également en évidence une différence significative entre les traitements N0P0, N0P1 et N2P2 dans les hampes florales. Les tests ne montrent aucune différence significative pour les parties foliaires et pour les plantes entières (Tableau 2.4 et Figure 2.20). Cependant l'allure de graphes suggère un effet positif de la dose d'azote apporté sur la quantité d'azote assimilé. Les quantités d'azote dans les plantes entières sont comprises entre 57 mg/plante (N0P0) et 156 mg/plante (N2P2).

**Tableau 2.4.** Quantités d'azote (mg/plante, rapporté à la matière sèche) dans les différentes parties de *C. comosa*, en fonction des 9 traitements de fertilisation

Quantité de N dans les parties (mg/plante)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	21,96 a	39,54 ab	44,36 ab	32,32 ab	39,43 ab	90,31 b	26,89 ab	57,74 ab	107,2 b
	Erreur standard (+/-)	11,9	23,4	21,5	24,2	24,3	38,2	15,1	18,1	54,4
Foliaires	Moyenne	138,1 a	173,1 a	215,2 a	186,3 a	201,2 a	250,2 a	258,5 a	229,1 a	293,1 a
	Erreur standard (+/-)	50,3	70,1	134,9	90,6	141,5	76,5	196,8	123,7	191,4
Hampes	Moyenne	12,3 a	10,4 a	14,4 ab	15,5 ab	25,6 ab	40,2 ab	14,1 ab	36,5 ab	66,3 b
	Erreur standard (+/-)	6,4	4,6	12,1	8,7	22,4	34,5	12,8	21,3	23,0
Totale	Moyenne	172,3 a	222,9 a	274,0 a	234,1 a	266,3 a	380,7 a	299,5 a	323,4 a	466,6 a
	Erreur standard (+/-)	60,9	90,3	166,0	105,0	170,7	119,2	221,8	142,7	256,2

NB : Les différentes lettres, à côté des données de moyennes, indiquent les différences significatives au vu du test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)

**Figure 2.20.** Quantités moyennes d'azote (mg/plante) dans les différentes parties d'une plante de *C. comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

NB : Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions). Test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis) **non significatif ( $P < 0,05$ ) : pas de différence entre les quantités d'azote de chaque traitement pour la plante entière**

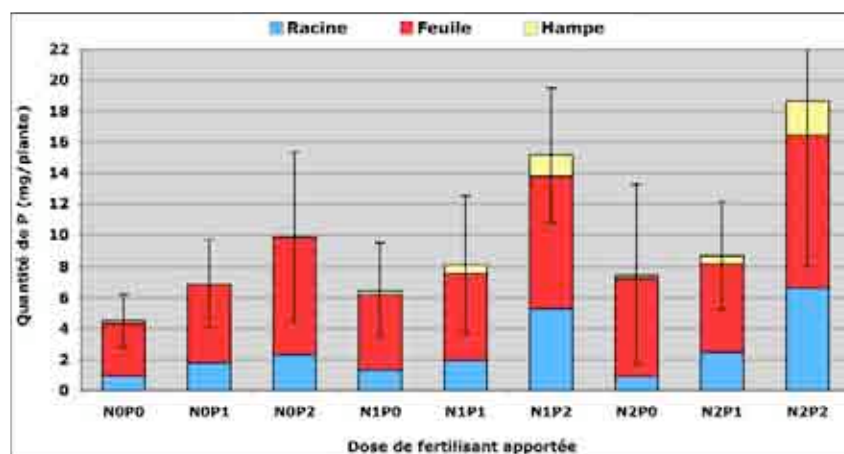
Les quantités de phosphore dans les racines sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ) entre les traitements N0P0, N1P0, N2P0 (groupe a) et les traitements N1P2, N2P2 (groupe bc) (Tableau 2.5). Dans les feuilles, les quantités de phosphore ne sont pas significativement différentes entre les 9 traitements (toutefois les traitements avec la dose P2 montrent près de 3 fois plus de phosphore que le témoin P0N0). Les tests effectués sur les hampes florales et dans la plante entière

permettent de différencier deux traitements de fertilisation, N0P0 et N2P2 (Figure 2.21). La fertilisation en N semble avoir un rôle synergique sur l'assimilation de P, surtout à la dose P2, et ceci sur les trois tissus.

**Tableau 2.5.** Quantités de phosphore (mg/plante, rapporté à la matière sèche) dans les différentes parties de *C. comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

Quantité de P dans les parties (mg/plante)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	0,91 a	1,78 abc	2,32 abc	1,35 ab	1,93 abc	5,29 bc	0,90 a	2,45 abc	6,62 c
	Ecart-type (+/-)	0,52	0,98	0,95	1,12	0,68	2,09	0,58	0,69	2,52
Foliales	Moyenne	3,38 a	5,05 a	7,51 a	4,82 a	5,63 a	8,49 a	6,33 a	5,71 a	9,79 a
	Ecart-type (+/-)	1,19	1,88	4,45	2,35	3,56	2,32	5,11	2,85	6,86
Hampes	Moyenne	0,20 a	0,24 ab	0,35 ab	0,25 ab	0,54 ab	1,36 ab	0,21 a	0,54 ab	2,20 b
	Ecart-type (+/-)	0,18	0,15	0,29	0,13	0,78	1,86	0,18	0,41	1,47
Totale	Moyenne	4,49 a	7,06 ab	10,17 ab	6,42 ab	8,10 ab	15,13 ab	7,45 ab	8,70 ab	18,62 b
	Ecart-type (+/-)	1,70	2,79	5,48	3,04	4,42	4,35	5,80	3,43	10,59

NB : Les différentes lettres, à côté des données de moyennes, indiquent les différences significatives au vu du test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)



**Figure 2.21.** Quantités moyennes de phosphore (mg/plante) dans les différentes parties d'une plante de *C. comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

NB : Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions). Test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis) **significatif** ( $P < 0,05$ ) : **différence entre N0P0 et N2P2 pour la quantité de phosphore dans la plante entière**

Les analyses statistiques de la quantité de nickel dans les racines mettent en évidence des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre les traitements N0P0 (0,4



mg/plante) et N2P2 (2,6 mg/plante) (Tableau 2.6). Au sein de la plante entière, des différences sont également observées entre les traitements N0P0, N0P1 (groupe a) (0,7 mg/plante) et le traitement N2P2 (groupe b) (3,1 mg/plante). Les tests ne montrent aucune différence significative entre les traitements pour la partie foliaire, bien que les valeurs soient environ 2 fois plus élevées pour les traitements comportant les doses P2 ou N2.

**Tableau 2.6.** Quantités de nickel (mg/plante, rapporté à la matière sèche) par plante dans les différentes parties de *C. comosa*, en fonction des 9 traitements de fertilisation

Quantité de Ni dans les parties (mg/plante)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	1,25 a	1,75 ab	3,14 ab	2,43 ab	3,11 ab	5,96 ab	1,42 ab	3,11 ab	7,90 b
	Erreur standard (+/-)	0,71	0,98	2,86	2,27	2,30	3,73	0,68	1,63	4,76
Foliaires	Moyenne	0,40 a	0,39 a	0,83 a	0,46 a	0,75 a	0,81 a	0,83 a	0,68 a	0,92 a
	Erreur standard (+/-)	0,23	0,15	0,66	0,25	0,88	0,38	0,63	0,53	0,73
Hampes	Moyenne	0,14 ab	0,08 a	0,23 ab	0,26 ab	0,27 ab	0,40 ab	0,17 ab	0,38 ab	0,72 b
	Erreur standard (+/-)	0,13	0,04	0,22	0,24	0,17	0,37	0,15	0,18	0,35
Totale	Moyenne	1,79 a	2,21 a	4,21 ab	3,13 ab	4,13 ab	7,17 ab	2,41 ab	4,18 ab	9,54 b
	Erreur standard (+/-)	0,95	1,09	3,68	2,35	3,22	3,88	1,43	2,17	5,54

NB : Les différentes lettres, à côté des données de moyennes, indiquent les différences significatives au vu du test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)

### 2.3.3.3. Comparaison des teneurs en éléments des plants de *C. comosa* cultivés au champ (N0P0) et des plants de *C. comosa* prélevés dans le milieu naturel

Les plants de *C. comosa* en milieu naturel ont été prélevés à proximité des cultures dans une zone de maquis ligno-herbacé. On constate que les concentrations moyennes d'azote dans les feuilles sont deux fois plus importantes chez les plantes cultivées (0,89%), comparées à celles du milieu naturel (0,45%) (Tableau 2.7). Le rapport de la concentration en azote entre les racines et les feuilles des plantes cultivées est proche de 1/3, à la différence des plants prélevés en milieu naturel chez lesquelles ce rapport est plus proche de 1. Les concentrations en phosphore des plants naturels sont de l'ordre de 240 mg/kg dans les feuilles et les racines (rapport proche de 1). Pour les plantes cultivées, malgré une concentration

**Tableau 2.7.** Comparaison des concentrations (en % ou en mg/kg de matière sèche), en éléments analysés dans les différentes parties des plants de *C. comosa*, entre ceux cultivés en plein champ (NOP0) et ceux prélevés en milieu naturel

Comparaison des concentration en éléments dans les parties de <i>C. comosa</i>		N %		P mg/kg		K %		Mg %		Ni mg/kg	
		MN*	PC*	MN	PC	MN	PC	MN	PC	MN	PC
<b>Racines</b>	<b>Moyenne</b>	0,37	0,33	257	136	0,23	0,26	0,10	0,21	121	196
	<b>Erreur standard (+/-)</b>	0,18	0,03	163	10	0,09	0,0,9	0,02	0,02	37	48
<b>Parties aériennes</b>	<b>Moyenne</b>	0,45	0,89	235	219	0,61	0,74	0,08	0,08	27	25
	<b>Erreur standard (+/-)</b>	0,11	0,03	71	28	0,09	0,08	0,03	0,01	11	8
<b>Parties aériennes desséchées</b>	<b>Moyenne</b>	0,36	/	31	/	0,04	/	0,05	/	92	/
	<b>Erreur standard (+/-)</b>	0,26	/	11	/	0,01	/	0,01	/	38	/

\* MN : milieu naturel

PC : plantes cultivées (NOP0)

Nombres de plants analysés prélevés en milieu naturel : n = 5

Nombres de plants cultivés analysés : n = 15

foliaire de l'ordre de 220 mg/kg, le rapport entre les parties racinaires et aériennes est proche de 1/2.

Les concentrations en magnésium, potassium et nickel dans les parties aériennes et racinaires sont similaires entre les plants cultivés et ceux prélevés dans le milieu naturel.

Par comparaison entre les concentrations dans les feuilles mortes et les feuilles vertes, les résultats suggèrent une réallocation importante des éléments phosphore et potassium (proche de 90%) signe probable d'une adaptation de la plante à la très faible disponibilité en P du milieu (Tableau 2.7). Les éléments azote et magnésium apparaissent être redistribués dans des proportions moins importantes (respectivement réallocation d'environ 20 et 40 %).

### **2.3.4. Dynamique de l'azote et du phosphore dans les sols lors de l'essai de fertilisation**

#### **2.3.4.1. Estimation de la quantité d'azote et de phosphore apportée par kg de sol**

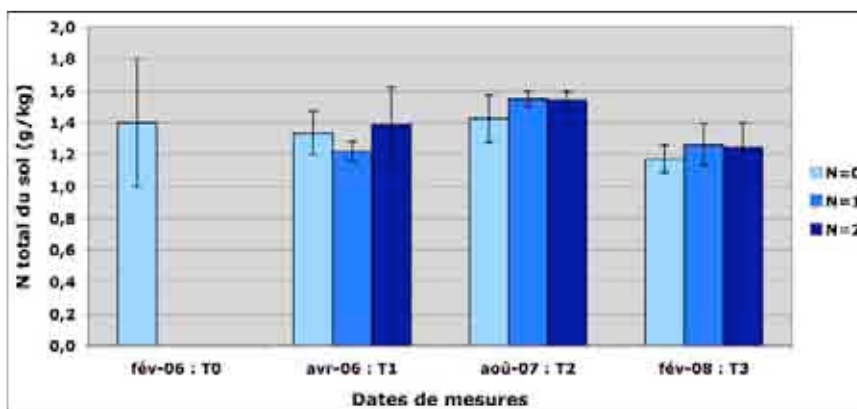
En considérant que les racines de Cyperaceae explorent le sol sur une profondeur d'environ 30 cm, le volume de sol correspondant à une surface de 1 hectare (ha) est de 3 000 m<sup>3</sup>. La densité apparente moyenne du sol ferrallitique étant d'environ 1,5 g/cm<sup>3</sup>, la masse du sol correspondant à une surface de 1 ha est alors de 4 500 tonnes.

Pour la fertilisation azotée, on apporte 100 kg N/ha (dose N1) et 500 kg N/ha (dose N2), soit respectivement 0,02 g d'azote par kg de sol et 0,11 g d'azote par kg de sol. L'apport d'azote est donc négligeable par rapport à la quantité d'azote total initialement présente ( $T_0$ ) dans le sol (environ 1,4 g/kg), l'apport de la dose N1 correspond à un apport de 1,4 % de la teneur initiale et celui de la dose N2 à un apport de 7,9% (cf. 2.1.2.1.).

Pour la fertilisation phosphatée, on apporte 43,6 kg P/ha (dose P1) et 218 kg P/ha (dose P2), l'apport est donc 9,7 mg de phosphore par kg de sol pour la dose P1 et de 48,4 mg de phosphore par kg de sol pour la dose P2. La teneur moyenne en phosphore total du sol à  $T_0$  étant de 154 ppm, l'apport de la dose P1 correspond à un apport de 6,3% de la teneur initiale et celui de la dose P2 à un apport de 31,4% (cf. § 3.1 et 3.2).

### 2.3.4.2. Évolution de la teneur en azote total et en phosphore total des sols non-rhizosphériques au cours de l'essai

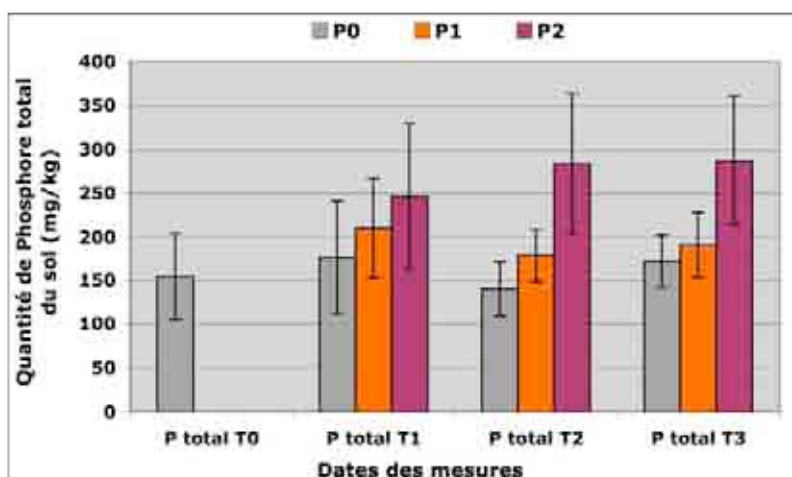
Les mesures moyennes d'évolution de la quantité d'azote total dans les sols non-rhizosphériques (zone hors influence racinaire) en fonction des doses de fertilisant ne montrent pas de différence significative au cours du temps (Fig 2.22). Les faibles quantités d'azote apportées par les traitements ne permettent pas de mettre en évidence des variations notables du stock d'azote total dans les sols fertilisés par rapport au stock initial. L'hétérogénéité des sols avant fertilisation ( $t_0$  = février 2006) est également responsable de l'absence de différence statistiquement significative, bien que l'on puisse remarquer que les données aux temps  $t_1$  à  $t_3$  montrent une meilleure homogénéité. Ainsi, il semble que la quantité d'azote total ait diminué entre  $t_2$  et  $t_3$  pour les traitements N0, N1 et N2, laissant supposer un prélèvement par les plantes ou la lixiviation de l'azote au cours de la saison des pluies (Fig 2.22).



**Figure 2.22.** Evolution des teneurs en azote total des sols non-rhizosphériques au cours du temps en fonction des doses d'azote apportées par la fertilisation

*NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque dose d'azote sont réalisées sur 15 analyses de sols. Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis non significatif*

Les représentations graphiques des teneurs en phosphore total des sols suivant les trois traitements de fertilisation montrent une différence significative entre les groupements P0 (environ 175 mg/kg) et P2 (environ 280 mg/kg) aux dates  $t_2$  et  $t_3$  ( $P < 0,05$ ) (Fig 2.23). L'augmentation observée est supérieure aux quantités théoriques attendues ( $P1 = 7\%$  ;  $P2 = 31\%$ ), probablement dû aux approximations effectuées lors de l'estimation des quantités de phosphore apporté (profondeur de sol utilisée pour le calcul) : il est probable que le phosphore apporté ne soit finalement resté que sur les 10 ou 15 cm supérieurs du sol.

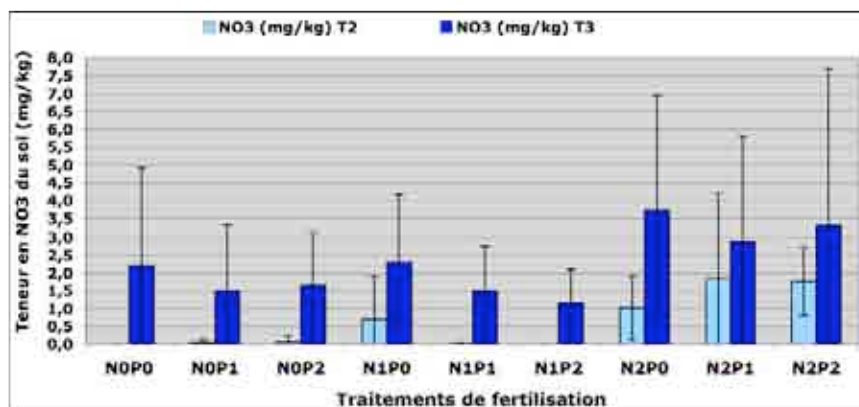


**Figure 2.23.** Évolution de la quantité de phosphore total des sols non-rhizosphériques au cours du temps

NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque dose de P sont réalisées sur 15 analyses de sols. Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis significatif ( $P < 0,05$ ) : **P0 T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub> différents de P2 T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub>**

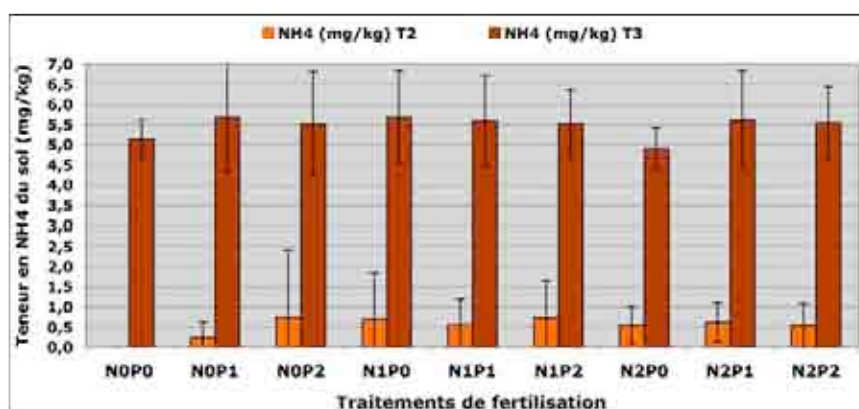
#### 2.3.4.3. Évolution de la teneur en azote assimilable ( $\text{NO}_3^-$ et $\text{NH}_4^+$ ) et en phosphore assimilable ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) des sols non-rhizosphériques

L'analyse des quantités de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) a été effectuée uniquement sur les sols prélevés au temps  $t_2$  et  $t_3$ . Il est donc uniquement possible de comparer leurs teneurs à ces deux dates. Du fait des très fortes variabilités des mesures, les analyses statistiques de comparaison de moyennes (test de Kruskal-Wallis) ne mettent en évidence aucune différence significative entre les 9 traitements et entre les deux dates de prélèvements pour la quantité de  $\text{NO}_3$  dans les sols (Fig. 2.24). Cependant on observe systématiquement des valeurs moyennes de  $\text{NO}_3$  au temps  $t_3$  (février 08) toujours supérieures à celles du temps  $t_2$  (août 07), et des valeurs également supérieures pour la dose N2 par rapport à N0 et N1. De même, les analyses statistiques effectuées sur les quantités de  $\text{NH}_4$  ne montrent pas de différence significative entre les 9 traitements au sein de chaque date de prélèvement (Fig. 2.25). Par contre une différence nettement significative est observée entre les quantités de  $\text{NH}_4$  à  $t_2$  et à  $t_3$ .



**Figure 2.24.** Teneurs en nitrate (NO<sub>3</sub>) des sols non-rhizosphériques à T<sub>2</sub> (août 2007) et T<sub>3</sub> (février 2008)

NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque traitement sont réalisées sur 5 analyses de sols. Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis non significatif

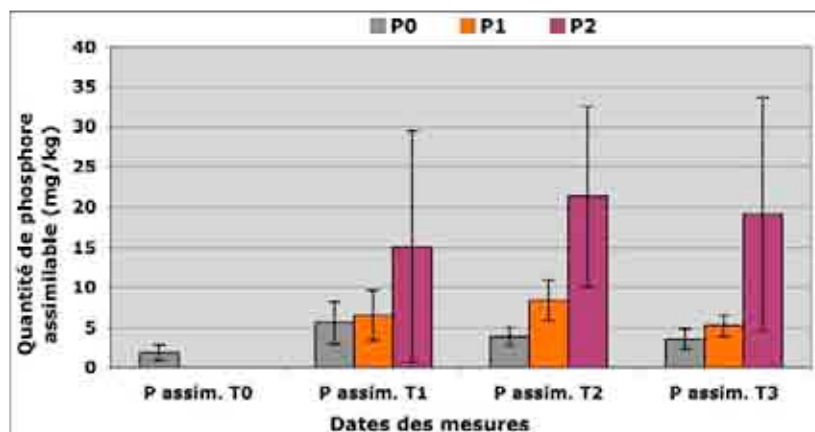


**Figure 2.25.** Teneurs en NH<sub>4</sub> des sols non-rhizosphériques à T<sub>2</sub> (août 2007) et T<sub>3</sub> (février 2008)

NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque traitement sont réalisées sur 5 analyses de sols. Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis significatif ( $P < 0,05$ ) : T<sub>2</sub> différent de T<sub>3</sub>

Sur la Figure 2.26, on observe une augmentation de la quantité de phosphore assimilable dans les sols suite à la fertilisation ( $P_0 < P_1 < P_2$ ), indiquant un effet positif de la fertilisation sur le stock de phosphore assimilable. Une différence significative est observée entre les traitements P<sub>0</sub> ( $< 5$  mg/kg) et P<sub>2</sub> ( $> 18$  mg/kg) aux dates t<sub>2</sub> et t<sub>3</sub> de prélèvement. En revanche, il n'y a pas de différence significative de la quantité de phosphore assimilable entre les parcelles ayant reçu une dose P<sub>1</sub> ou P<sub>2</sub>. Une augmentation est également observée entre les témoins (P<sub>0</sub>) aux dates t<sub>0</sub> (P<sub>0</sub> assim  $< 2,5$  mg/kg) et t<sub>1</sub> (P<sub>0</sub> assim  $> 5$  mg/kg) alors qu'aucun apport de phosphore n'a été fait, laissant supposer un impact des travaux du sol (labour) sur le stock de phosphore assimilable. Aucune différence significative n'est observée au

sein des 3 traitements au cours du temps, indiquant que le stock de phosphore assimilable dans les sols non-rhizosphériques reste relativement stable au cours des 2 ans de culture pour chaque groupe de fertilisation.



**Figure 2.26.** Évolution de la quantité de phosphore assimilable des sols non-rhizosphériques au cours du temps

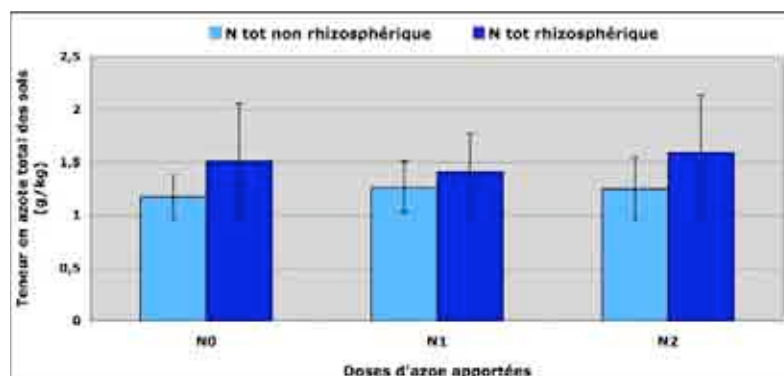
NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque dose de P sont réalisées sur 15 analyses de sols. Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis significatif ( $P < 0,05$ ) :  $P0\ T_2$  et  $T_3$  différents de  $P2\ T_2$  et  $T_3$

#### 2.3.4.4. Comparaison de la composition en nutriment (N et P) des sols rhizosphériques et non-rhizosphériques en fin d'expérimentation (T3)

##### 2.3.4.4.1. Comparaison des teneurs en azote de la rhizosphère et du sol nu

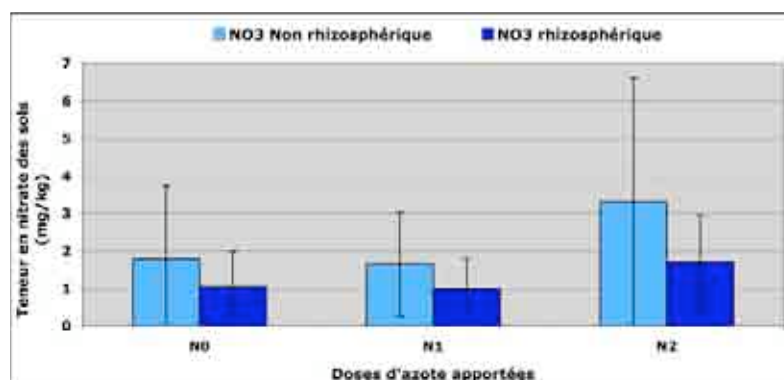
Les analyses statistiques de comparaison de moyennes effectuées sur les quantités d'azote total dans le sol non-rhizosphérique et dans la rhizosphère de *C. comosa*, en les traitements, ne mettent pas en évidence de différence significative (Fig. 2.27).

La teneur en nitrate des sols rhizosphériques est inférieure à celle des sols non-rhizosphériques pour les trois doses d'azote, mais ces différences sont non significatives (Fig. 2.28). On peut estimer les prélèvements de nitrate assimilé par les plants de *Costularia* en faisant la différence :  $\text{NO}_3^-$  non-rhizosphérique –  $\text{NO}_3^-$  rhizosphérique. On obtient des prélèvements de  $\text{NO}_3^-$  compris entre 0,6 et 1,5 mg/kg de sol avec une différence supérieure pour la dose d'azote N2 (Fig 2.28).



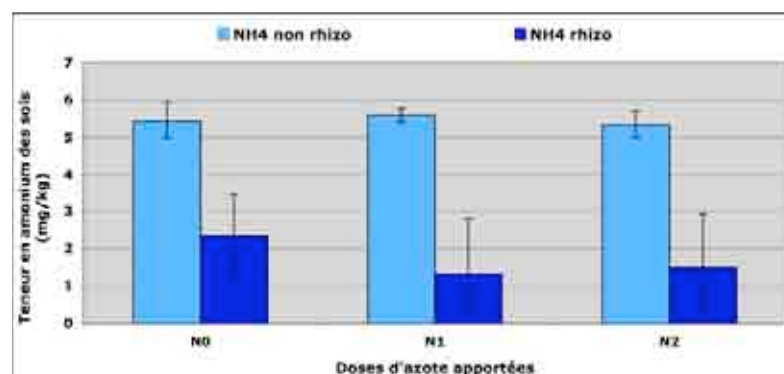
**Figure 2.27.** Teneurs en azote total dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à  $T_3$  en fonction des doses d'azote apportées

NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque dose d'azote sont réalisées sur 15 analyses de sols. Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis non significatif ( $P < 0,05$ )



**Figure 2.28.** Teneurs en nitrates dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à  $T_3$  en fonction des doses d'azote apportées

NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque dose d'azote sont réalisées sur 15 analyses de sols. Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis non significatif ( $P < 0,05$ )



**Figure 2.29.** Teneurs en ammonium dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à  $T_3$  en fonction des doses d'N apportées

NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque dose d'azote sont réalisées sur 15 analyses de sols. Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis significatif ( $P < 0,05$ ) :  $NH_4$  non-rhizo différent de  $NH_4$  rhizo

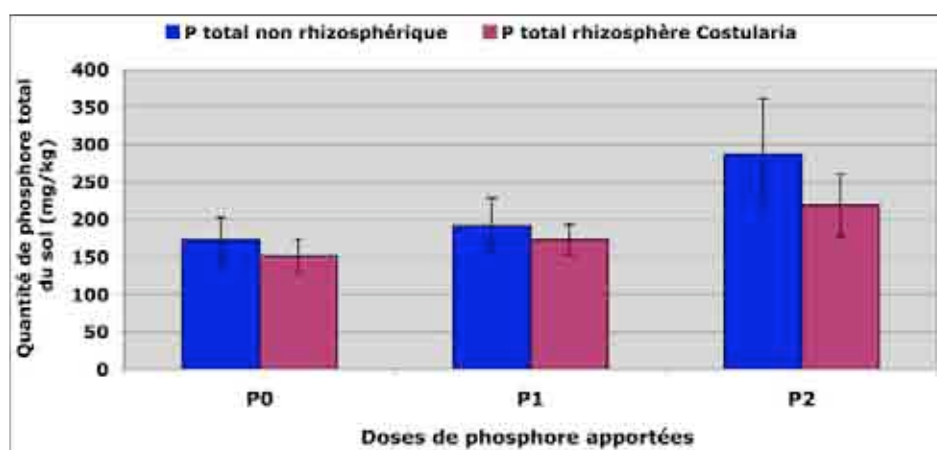


La teneur en  $\text{NH}_4^+$  des sols rhizosphériques est significativement inférieure à celle du sol non-rhizosphérique ( $P < 0,05$ ), et ceci quelle que soit la dose d'azote apportée au départ (Fig 2.29). On peut également estimer les prélèvements de  $\text{NH}_4$  par les plants de *Costularia* en faisant la différence :  $\text{NH}_4$  non-rhizosphérique –  $\text{NH}_4$  rhizosphérique. On obtient des prélèvements de  $\text{NH}_4$  compris entre 3 et 4 mg/kg de sol quelle que soit la dose d'azote apportée.

La teneur moyenne de l'azote minéral disponible dans les sols est inférieure à 10 mg/kg, le prélèvement rhizosphérique des molécules assimilables ( $\text{NO}_3 + \text{NH}_4$ ) est compris entre 3,5 et 5,5 mg/kg, ce qui est très faible en comparaison de la quantité moyenne d'azote total dans les sols (1500 mg/kg). Par ailleurs, en comparant avec les quantités de N prélevées par les plantes (entre 57 et 156 mg/plant, tableau 2.3), on peut estimer que les racines ont absorbé de l'azote dans un volume de sol équivalent à environ 15 à 30 kg ( $57/3,5$  et  $156/5,5$ ).

#### 2.3.4.4.2. Comparaison des teneurs en phosphore de la rhizosphère et du sol nu

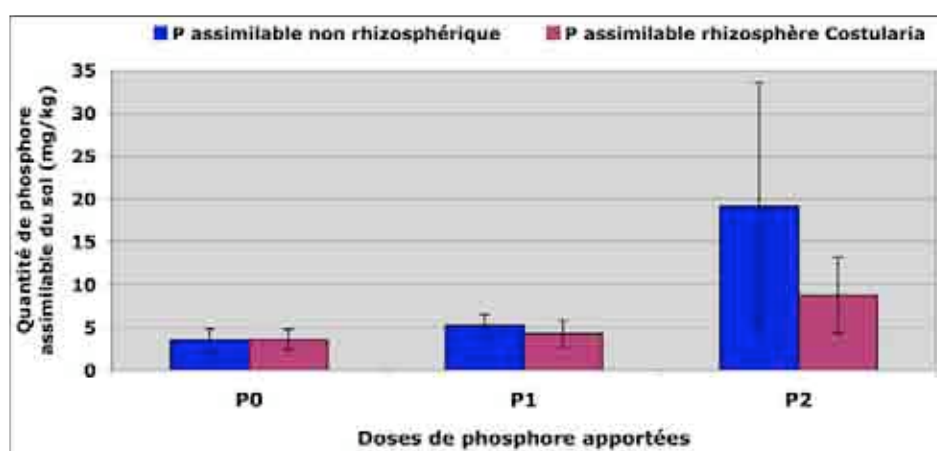
En fin d'expérimentation ( $t_3$ ), la quantité de phosphore total apparaît plus faible dans les sols rhizosphériques (Fig 2.30). Cette diminution n'est pas significative, mais il faut noter que pour le traitement P2, la teneur moyenne est de 280 mg/kg pour les sols non-rhizosphériques et de 220 mg/kg pour les sols rhizosphériques).



**Figure 2.30.** Quantité de phosphore total dans le sol rhizosphérique et non-rhizosphérique à  $T_3$  en fonction des doses de phosphore apportées

NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque dose d'azote sont réalisées sur 15 analyses de sols. **Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis non significatif ( $P < 0,05$ )**

De même, à  $t_3$ , les comparaisons des teneurs en phosphore assimilable des sols rhizosphériques et non-rhizosphériques sont non significatives (Fig 2.31). En effet, on n'observe pas de différence entre les deux types de sols pour les traitements P0 et P1. Cependant pour le traitement P2, on note une forte augmentation des teneurs en phosphore assimilable des sols, mais avec une diminution importante de cette teneur dans les sols rhizosphériques (P sols rhizosphériques : 8 mg/kg ; P sols non-rhizosphérique : 18 mg/kg). Ceci indique qu'une forte fertilisation phosphatée permet à *Costularia comosa* de prélever des quantités relativement importantes de P dans le sol.



**Figure 2.31.** Quantité de phosphore assimilable dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à  $T_3$  en fonction des doses de phosphore apportées

NB : Les analyses de sols sont réalisées sur les 45 placettes, les moyennes pour chaque dose de P assimilable sont réalisées sur 15 analyses de sols. **Test de comparaison de moyenne Kruskal-Wallis non significatif ( $P < 0,05$ )**

### 2.3.6. Analyse de la mycorhization des plants suivis

Les mesures de mycorhization sont effectuées uniquement sur les plants suivis des placettes ayant reçu les traitements de fertilisation N0P0, N0P2, N2P0 et N2P2, et au temps t3 en fin d'expérimentation.

#### 2.3.6.1. Taux de mycorhization selon les traitements de fertilisation

Les analyses statistiques de comparaison de moyennes (test de Kruskal-Wallis) des intensités globales de mycorhization (M%) mettent en évidence une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les traitements à dose de phosphore nul et ceux à doses fortes (N2P2 et N0P2  $>$  N0P0 et N2P0) (Tableau 2.8). Une différence significative est également mise en évidence, pour les % d'arbuscules ou de vésicules, entre le traitement témoin (N0P0) et les traitements à dose forte de phosphore (P2), indiquant que le développement des champignons mycorhiziens à arbuscule (AMF) est significativement plus élevé dans les parcelles additionnées de phosphore.

**Tableau 2.8.** Effets de la dose d'azote et de phosphore sur les intensités globales, arbusculaires et vésiculaires de mycorhization des plants de *Costularia comosa*

Intensité de mycorhization		N0P0	N0P2	N2P0	N2P2
Intensité globale (M%)	Moyenne	<b>2,94 a</b>	<b>18,19 b</b>	<b>5,46 a</b>	<b>21,25 b</b>
	Erreur standard (+/-)	2,67	15,53	5,43	9,53
Intensité arbusculaire (A%)	Moyenne	<b>1,03 a</b>	<b>4,76 b</b>	1,96 ab	<b>3,95 b</b>
	Erreur standard (+/-)	1,01	4,20	1,56	1,50
Intensité vésiculaire (V%)	Moyenne	<b>0,38 a</b>	<b>7,29 b</b>	<b>1,46 a</b>	<b>5,01 b</b>
	Erreur standard (+/-)	0,27	6,13	1,10	3,73

NB : Les différentes lettres, à côté des données de moyennes, indiquent les différences significatives ( $P < 0,05$ ) au vu des tests de comparaison des 4 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (3 individus par placette \* 5 lignes)

#### 2.3.6.2. Corrélation entre les poids secs des plantes et les intensités de mycorhization

Sur l'ensemble des plants étudiés selon les 4 traitements de fertilisation retenus pour l'observation des endomycorhizes, aucune corrélation (matrice de similarité et de dissimilarité  $n = 60$ ) n'apparaît entre les intensités de mycorhization et les poids secs des plantes. Lorsque l'on considère le groupe d'échantillon N2P2 séparément ( $n = 15$ ), on constate une corrélation positive significative (seuil de signification :

0,5139) entre les intensités arbusculaires et le poids sec total de la plante ( $r = 0,680$ ), mais aussi le poids sec des feuilles ( $r = 0,747$ ) et des hampes florales ( $r = 0,549$ ) (Tableau 2.9).

**Tableau 2.9.** Matrice de corrélation (coefficient de Pearson) entre les paramètres de mycorhization et les poids de matières sèches des plants fertilisés avec le traitement N2P2

N2P2	M (%) <sup>*</sup>	A (%)	V (%)
M (%)	1	0,067	0,505
A (%)	0,067	1	0,118
V (%)	0,505	0,118	1
Poids racines	-0,431	0,399	0,039
Poids feuilles	-0,226	<b>0,747</b>	0,081
Poids hampes	-0,225	<b>0,549</b>	0,028
Poids total	-0,273	<b>0,680</b>	0,064

\* M (%) intensité globale de mycorhization ; A (%) intensité arbusculaire de mycorhization ; V (%) intensité vésiculaire de mycorhization

NB : Les corrélations sont effectuées sur 15 échantillons. Les valeurs en gras sont significatives, indiquant une corrélation (seuil de signification : 0,513 ;  $n = 60$ ) entre les 2 paramètres pour le traitement N2P2

### 2.3.6.3. Corrélation entre les taux de phosphore total et assimilable dans les sols et les intensités de mycorhization

Des analyses statistiques de corrélation entre les différents paramètres de mycorhization des plantes et les teneurs en phosphore total et assimilable des sols aux trois dates de prélèvement,  $t_1$ ,  $t_2$  et  $t_3$  sont réalisées (seuil de significativité : 0,255) (Tableau 2.10). L'analyse des résultats met en évidence des corrélations positives significatives (seuil de signification : 0,255) entre l'intensité de mycorhization (M%), l'abondance des arbuscules (A%) et des vésicules (V%) et les teneurs en phosphore assimilable ou/et total des sols. Ces données confirment l'impact de la fertilisation phosphatée testée dans les conditions de l'étude sur les intensités de mycorhization des plants de *C. comosa*.

**Tableau 2.10.** Matrice de corrélation (coefficient de Pearson) entre les paramètres de mycorhization et les taux de P dans les sols pour les quatre traitements de fertilisation étudiés

	<b>M (%)*</b>	<b>A (%)</b>	<b>V (%)</b>
<b>M (%)</b>	<i>1</i>	<i>0,833</i>	<i>0,881</i>
<b>A (%)</b>	<i>0,833</i>	<i>1</i>	<i>0,855</i>
<b>V (%)</b>	<i>0,881</i>	<i>0,855</i>	<i>1</i>
<b>P assimilable T1</b>	<b>0,324</b>	0,132	0,076
<b>P assimilable T2</b>	<b>0,301</b>	<b>0,299</b>	0,203
<b>P assimilable T3</b>	0,169	<b>0,270</b>	0,227
<b>P total T1</b>	<b>0,336</b>	0,240	0,206
<b>P total T2</b>	<b>0,370</b>	<b>0,313</b>	<b>0,243</b>
<b>P total T3</b>	<b>0,331</b>	<b>0,404</b>	<b>0,352</b>

\* M (%) intensité globale de mycorhization ; A (%) intensité arbusculaire de mycorhization ; V (%) intensité vésiculaire de mycorhization

NB : les valeurs en gras sont significatives indiquant une corrélation (seuil de signification : 0,255,  $n = 60$ ) entre les 2 paramètres

#### 2.3.6.4. Corrélation entre les concentrations en éléments N, Mg, K, P, Ni dans la plante et les intensités de mycorhization

Les corrélations obtenues sont positives et significatives (seuil de signification : 0,255) entre le phosphore dans l'ensemble de la plante (P plante) et les paramètres de mycorhization : M% et P feuilles = 0,399 ; A% et P feuilles = 0,348 ; V% et P feuilles = 0,285 (Tableau 2.11). Deux autres paramètres, la concentration d'azote et celle du phosphore dans les racines, sont corrélés positivement aux trois paramètres de mycorhization. Ceci indique clairement que les tissus des plantes mycorhizées sont plus concentrés en phosphore et que la symbiose semble fonctionnelle pour le phosphore et l'azote.

**Tableau 2.11.** Matrice de corrélation (coefficient de Pearson) entre les paramètres de mycorhization et les concentrations en éléments N, P, K, Ni dans la plante pour les quatre traitements de fertilisation étudiés

	<b>M (%)*</b>	<b>A (%)</b>	<b>V (%)</b>
<b>M (%)</b>	1	0,833	0,881
<b>A (%)</b>	0,833	1	0,855
<b>V (%)</b>	0,881	0,855	1
<b>% N feuilles</b>	0,060	0,084	0,090
<b>mg/kg P feuilles</b>	<b>0,399</b>	<b>0,348</b>	<b>0,285</b>
<b>% K feuilles</b>	-0,098	0,008	0,029
<b>mg/kg Ni feuilles</b>	-0,169	-0,022	-0,079
<b>% N racines</b>	<b>0,553</b>	<b>0,332</b>	<b>0,341</b>
<b>mg/kg P racines</b>	<b>0,634</b>	<b>0,450</b>	<b>0,403</b>
<b>% K racines</b>	0,314	0,201	0,191
<b>mg/kg Ni racines</b>	-0,040	0,154	-0,006
<b>% N hampes</b>	0,174	0,024	0,048
<b>mg/kg P hampes</b>	<b>0,384</b>	0,118	0,067
<b>% K hampes</b>	-0,280	-0,308	-0,215
<b>mg/kg Ni hampes</b>	0,189	0,084	0,072

\* M (%) intensité globale de mycorhization ; A (%) intensité arbusculaire de mycorhization ; V (%) intensité vésiculaire de mycorhization

NB : les valeurs en gras sont significatives indiquant une corrélation (seuil de signification : 0.255 ; n = 60) entre les 2 paramètres

Les teneurs en Ni dans les feuilles ne sont pas corrélées à la mycorhization lorsque l'on considère l'ensemble des échantillons. Cependant, en considérant uniquement le traitement N2P2, on constate des corrélations négatives significatives (seuil de signification : 0,513) entre la teneur en Ni dans les feuilles et l'intensité de mycorhization ( $r = -0,577$ ) et entre la teneur en Ni dans les racines et l'intensité de mycorhization ( $r = -0,765$ ). Ceci indiquerait que lorsque la plante n'est pas carencée en P et que l'activité mycorhizienne est donc suffisante, les symbiotes mycorhiziens réduisent les quantités de Ni qui pénètrent dans la plante.

## 2.4. Discussion

Les expérimentations de terrain sur des données de croissance de plante aboutissent généralement à des valeurs dont les écart-types sont élevés, en raison de l'intervention de nombreux facteurs externes difficiles à contrôler. Ceci explique que pour divers paramètres mesurés ici, des valeurs moyennes allant du simple au double n'apparaissent pas toujours significatives. Malgré cet inconvénient, les comparaisons statistiques font ressortir un certain nombre de conclusions intéressantes.

Les résultats obtenus sur les cultures de *Costularia comosa* en plein champ ne trouvent aucune comparaison dans la littérature au sein de cette famille. En effet, à notre connaissance, aucun travail de ce type avec des espèces endémiques n'a été réalisé sur des sols ultramafiques. Nos résultats apparaissent différents des résultats obtenus traditionnellement dans des expérimentations de fertilisation sur des cultures de graminées dans des sols arables (e.g. Lemaire et Papin 1985). En effet, la fertilisation azotée des sols arables stimule généralement la multiplication des talles et la fertilisation phosphatée augmente la fructification (Tisdale et al. 1985). Dans notre expérimentation, il apparaît que le manque de phosphore est le principal facteur limitant du tallage et de la fructification chez *C. comosa*. Ces résultats confirment que dans les sols ferrallitiques ferritiques en milieu naturel, le premier facteur limitant la croissance des plantes est la disponibilité des phosphates inorganiques très fortement complexés aux oxydes de fer (Dubus et Becquer 2001). En effet pour les plantes cultivées, comme le maïs, la carence en phosphore dans ces sols est levée par une application de l'ordre de 7 tonnes/ha de  $P_2O_5$  (Bonzon et al. 1997). Pour les plants de *C. comosa*, les rendements de fructification sont nettement améliorés et semblent satisfaisants avec une application de 500 kg/ha. Ainsi, la comparaison entre les statuts de nutrition chez les végétaux introduits cultivés et chez les végétaux endémiques sur sols ferrallitiques ferritiques stériles, montre l'adaptation (par la frugalité) des plantes endémiques aux fortes carences en nutriments et particulièrement aux faibles teneurs en phosphore (Bonzon et al. 1997 ; Dubus et Becquer 2001 ; Jaffré 1980).

Il faut souligner que dans nos essais les quantités d'intrants phosphatés semblent conséquentes mais sont relativement faibles par rapport à la quantité initiale dans les sols (P initiale ~ 150 mg/kg ; P1 = 7% et P2 = 30% de plus). La

fertilisation P2 (500 kg/ha) augmente cependant d'un facteur quatre la quantité de phosphore assimilable dans les sols par rapport aux témoins. Cette augmentation des teneurs en phosphore disponible des sols fertilisés se répercute positivement sur la quantité de phosphore assimilée par les plants de *C. comosa* augmentant sa croissance et la concentration en phosphore dans ses racines. La quantité d'intrant azoté, quant à elle, est faible par rapport à la quantité initiale d'azote dans les sols (N initiale  $\sim 1,5$  g/kg ; N2 = 500 kg/ha : 7% de plus). Aucune différence significative des paramètres de croissance n'est observée entre les 3 traitements azotés témoins (N0P0, N1P0, N2P0) indiquant que l'azote n'est pas le premier facteur limitant ou que l'apport testé est trop faible, ou que d'autres éléments minéraux sont limitants et empêchent la plante d'absorber l'azote en présence. Avec une fertilisation phosphatée, les plantes n'ayant reçu aucun apport d'azote sont moins vigoureuses et productives que celles qui en ont reçu, montrant dans ce cas un effet positif sur la croissance de la fertilisation azotée, même faible. En revanche, on constate peu de différence entre les individus ayant subi les traitements à dose d'azote N1 (100 kg/ha) ou N2 (500 kg/ha). Ce résultat plaide en faveur d'une carence forte en P, et d'une déficience assez forte mais non limitante en N. Il est à noter que la forte hausse de la quantité d'azote assimilable (nitrate et ammonium) observée en février 2008 ( $t_3$ ) par rapport aux quantités en août 2007 ( $t_2$ ) pourrait résulter d'un effet saisonnier. En effet, les échantillons prélevés à  $t_2$  correspondent au milieu de la saison froide et sèche et ceux de la date  $t_3$ , au milieu de la saison chaude et humide plus favorable à la dégradation de l'engrais azoté libérant des molécules assimilables (engrais à libération lente) et plus favorable à l'activité biologique dans les sols. Les phénomènes saisonniers ont un impact sur l'activité des microorganismes du sol, plus actifs durant la saison chaude et humide qui dégradent donc davantage les matières organiques, rendant plus disponibles l'azote sous forme de nitrates et d'ammonium.

Les Cyperaceae font partie des espèces des maquis calédoniens ayant des teneurs moyennes en N et P dans leurs tissus les plus faibles ( $\sim 0,5\%$  pour l'azote et  $0,02\%$  pour le phosphore) et les comportements nutritionnels à l'égard d'un ou plusieurs éléments sont similaires parmi les différentes espèces de la famille des Cyperaceae (Jaffré 1980). Nos résultats, montrant le rôle de la fertilisation sur la production et la vigueur de *Costularia comosa*, confirment que l'adaptation des espèces endémiques aux terrains ultramafiques se traduit par une réduction de leur



productivité et donc par une limitation de leur absorption d'éléments majeurs. En effet, l'addition de nutriment augmente la productivité des plantes dans les environnements ultramafiques naturels de Toscane (Chiarucci et al. 2003, 2007) et d'Ecosse (Proctor et Nagy 1992).

La comparaison des teneurs en éléments des plants de *C. comosa* sauvages et cultivés suggère que leur développement en pépinière puis en plein champ a permis une meilleure nutrition et une allocation en azote et phosphore plus forte vers les parties aériennes. Cette comparaison suggère aussi que la carence en phosphore des sols naturels, entraîne une allocation plus importante du phosphore vers les racines au détriment de la croissance des parties aériennes. La fertilisation, augmentant les teneurs en N et P dans la plante devrait également augmenter leur allocation vers les organes fructifères et ainsi probablement améliorer la quantité et la qualité des graines produites. Toutefois, les comparaisons des concentrations en éléments dans les différents tissus en fonction des traitements sont très délicates à faire. En effet, tous les organes ne sont probablement pas au même stade physiologique, des plants moins développés (traitement N0P0) sont comparés à des plants plus développés (par ex. ceux du traitement N2P2), alors qu'il a été souvent montré que les teneurs en nutriments dans les tissus végétaux varient tout au long du développement de la plante, avec des baisses au fur et à mesure qu'un organe se rapproche de son stade de sénescence (Chapin 1980 ; Himelblau et Amasino 2001 ; Nooden et al. 1997).

Pour la majorité des espèces des maquis, les pics de floraison se manifestent en fin de saison sèche (octobre - novembre), et les pics de fructification apparaissent au début de la saison humide (décembre - janvier) (Derroire et al. 2008). L'étude de la phénologie de *C. comosa*, effectuée en milieu naturel par Jaffré et Pelletier (1992), indique que le pic de maturation des fruits a lieu au mois de janvier. De la même manière qu'en milieu naturel, dans nos essais la maturation des graines en champ s'étend de décembre à février avec un pic au mois de janvier. Il apparaît que les nombres de graines produites avec les trois traitements à fortes valeurs d'intrants (N2P2, N1P2 et N2P1) sont statistiquement équivalents entre eux et supérieurs à ceux des six autres traitements (sans différence au niveau du poids des graines et de leur vigueur germinative). Ainsi, malgré son adaptation à des conditions édaphiques extrêmes, la fructification de *C. comosa* est augmentée avec les

fertilisations azotées et phosphatées testées sur les sols de la parcelle étudiée, ce qui répond à l'objectif pratique de l'essai en terme de production de semences.

Globalement, les quantités d'azote et de phosphore apportées s'avèrent donc avoir des effets positifs observés sur la croissance et le développement de *C. comosa*. Toutefois, il n'est pas certain que l'action positive de l'apport de phosphore soit uniquement due à un effet direct de cet élément. En effet, la colonisation par les AMF est connue pour améliorer et stimuler l'assimilation du phosphore et de l'azote (Hodge 2000 ; Marschner 1995 ; Smith et Read 1997 ; Schachtman et al. 1998). Dans la littérature, la famille des Cyperaceae est classiquement considérée comme non-mycorhizée (Miller et al. 1999 ; Tester et al. 1987), cependant plusieurs observations indiquent la présence de vésicules et d'hyphes de mycorhizes de type *Glomus* au sein des racines d'espèces de Cyperaceae (Lagrange et al. 2009a ; Muthukumar et al. 2004 ; Perrier et al. 2006a). Nos résultats suggèrent que pour l'espèce *Costularia comosa*, dans les sols ultramafiques, la très faible disponibilité du phosphore, et probablement celle de l'azote, est un élément limitant pour la mycorhization. Ils indiquent également que l'addition de phosphore et d'azote dans le sol induirait une meilleure mycorhization des plants et particulièrement une meilleure activité arbusculaire (siège des échanges champignon-plante) et par conséquent une amélioration de la croissance de la plante (Smith et Read 2008). Dans ce cas, l'absence de corrélation entre la mycorhization et la croissance, lorsque l'on considère tous les traitements, serait liée au fait que les carences en P et/ou N notamment pour les traitements N0P0, N0P2 et N2P0, induisent une photosynthèse réduite, insuffisante pour nourrir les symbiotes mycorhiziens en matière carbonée (Boukcim et Mousain 2001 ; Gavito et Miller 1998 ; Miller et al. 1995). L'absence d'activité arbusculaire empêche alors un effet rétroactif d'amélioration de la nutrition minérale. Le lien mycorhization/croissance, n'étant pas détectable pour ces 3 traitements, empêcherait donc la mise en évidence d'un lien à l'échelle de tous les traitements. L'augmentation de la croissance des plantes pourrait ainsi être un effet indirect de la fertilisation par l'intermédiaire d'une augmentation du taux de mycorhization des plantes entraînant une meilleure assimilation du phosphore et de l'azote (Gustafson et Casper 2004). Nos résultats confirment également que lorsque les plants de *Costularia comosa* ne sont pas carencés en P et que l'activité mycorhizienne est suffisante, les symbiotes mycorhiziens réduisent les quantités de

Ni qui pénètrent dans la plante, comme l'ont noté Lagrange et al. (2009a) dans une expérience en serre.

## 2.5. Conclusion

L'azote et le phosphore total présents naturellement dans les sols ne sont pas exclusivement sous forme disponible, l'azote peut être sous forme de matière organique plus ou moins labile et le phosphore complexé ou fixé fortement aux particules du sol. Ainsi, malgré l'apport apparemment négligeable de ces deux éléments par la fertilisation, ceux-ci, apportés sous des formes plus disponibles, ont joué un rôle positif dans la croissance et le développement des plants de *Costularia comosa*.

Ces travaux ont permis de montrer que les conditions expérimentales utilisées dans cet essai sont adaptées à la culture de *Costularia comosa* sur les sols ferrallitiques colluvionnés. Après un an de culture en pépinière et deux ans de croissance en plein champ, les doses de 500 kg/ha de  $P_2O_5$ , de 100 à 500 kg/ha d'azote à libération lente (suivant les teneurs initiales des sols) et de 200 kg/ha de  $K_2O$  ont apporté des résultats probants en termes de développement et de production de graines. Les rendements de graines produites exprimés en nombre de graines par mètre carré (correspondant à quatre plantes) avec le traitement N2P2 (~ 8800 graines/m<sup>2</sup>), sont quatre fois supérieures au traitement N0P0 (~ 1100 graines/m<sup>2</sup>). Le traitement N2P2 est donc susceptible d'être exploité en termes de production, de maturation et de récolte des graines à plus grande échelle. Lors des prochains essais, des dispositifs expérimentaux robustes seront mis en place pour valider la productivité des champs semenciers. L'affinage des connaissances sur les besoins de fertilisants en N, P, K pourrait être réalisé sur d'autres espèces de Cyperaceae endémiques et pionnières. Les graines de *Costularia comosa* mettent entre 3 et 5 semaines pour germer en chambre de germination indépendamment des traitements, ce qui correspond au temps de germination des graines *C. comosa* prélevées en milieu naturel. Ainsi le temps de germination et la viabilité des graines ne sont pas influencés par le mode de production.

En marge du présent essai, des essais complémentaires sur les pratiques culturales ont montré l'effet positif du paillage sur la croissance et la fructification de *Costularia comosa* (moyenne de 2000 graines en plus par pied avec les traitements N2P2, N1P2, N2P1). Le paillage retient l'humidité dans le sol en limitant l'évaporation

des eaux d'irrigation et permet également de limiter l'expansion des plantes envahissantes transportées lors des travaux.

Cette expérimentation a par ailleurs permis de confirmer de façon certaine le rôle que peut jouer la mycorhization dans la croissance et l'adaptation de *C. comosa* en milieu naturel, notamment lorsque le sol est peu carencé en phosphore. Une étude plus approfondie du statut mycorhizien *in situ* des espèces de *Costularia* néo-calédoniennes et du rôle de cette mycorhization dans leur croissance devra être réalisée pour mieux comprendre les stratégies d'adaptation des *Costularia* aux sols ultramafiques. Ultérieurement, des essais en serre et sur le terrain permettraient de préciser les effets des teneurs en phosphates du sol sur la mycorhization de *C. comosa* et ainsi de vérifier si certaines teneurs en phosphate sont inductrices et, à l'inverse, si d'autres sont inhibitrices de la mycorhization. L'objectif serait de définir la gamme de concentration idéale en phosphate disponible pour la formation d'une symbiose efficace, favorable à la croissance de la plante.

**Annexe 2.1.** Analyses chimiques de douze échantillons de sol latéritique colluvionnées prélevés sur le site d'étude avant perturbations par les techniques de culture

N°	pH		N total g/kg	C total g/kg	C/N	P assi. mg/kg	P total mg/kg	FUSION ALCALINE													
	H <sub>2</sub> O	KCl						Ca g/kg	Mg g/kg	Na mg/Kg	K mg/Kg	Ti g/Kg	Fe g/Kg	Co g/Kg	Cr g/Kg	Mn g/Kg	Ni g/Kg	Al g/Kg	Cu mg/Kg	Si g/Kg	Zn g/Kg
1	5,6	5,6	1,5	28,6	19,0	2	155	0,73	9,00	184,5	951	2,06	416	1,23	50,6	11,1	5,5	58,7	70,1	37,4	0,57
2	5,1	5,2	1,7	28,9	17,0	2	192	0,65	5,99	1059,3	929	1,95	375	1,25	36,1	17,5	5,2	54,9	69,3	54,5	0,48
3	5,5	5,1	3,1	63,2	20,2	3	140	2,15	13,57	55,7	615	1,37	355	1,10	33,1	10,8	6,6	38,9	45,0	76,5	0,43
4	5,1	4,7	2,6	65,8	25,1	4	243	0,44	3,96	72,8	236	1,74	345	1,04	27,0	16,5	4,4	50,5	47,6	63,2	0,40
5	5,4	5,3	2,2	41,6	18,9	4	232	0,61	3,71	61,3	-	1,91	401	1,16	37,0	15,5	5,1	56,8	55,2	29,4	0,42
6	5,1	5,1	2,0	33,0	16,6	4	211	0,10	4,07	0,0	201	1,91	401	1,06	31,7	15,8	4,3	55,8	50,7	40,2	0,42
7	5,7	5,3	2,3	40,5	18,0	4	169	1,51	10,70	69,7	23	1,61	379	1,11	31,8	13,9	5,0	45,4	41,7	63,8	0,43
8	6,1	5,8	2,2	36,4	16,7	4	206	2,02	10,07	69,8	-	1,70	415	1,15	35,5	12,8	5,2	48,7	41,8	47,4	0,45
9	5,2	5,1	1,6	29,2	18,5	4	222	0,18	3,91	97,5	76	2,05	387	1,22	34,3	13,9	4,5	59,1	45,5	29,2	0,47
10	5,3	5,1	2,1	44,0	21,3	3	176	0,36	1,43	54,7	25	1,53	435	0,58	28,1	6,5	4,6	44,9	34,7	17,5	0,37
11	6,0	5,7	2,2	40,2	18,2	5	207	1,71	0,00	37,0	40	1,54	445	0,52	31,3	4,5	5,4	45,0	38,2	9,4	0,37
12	6,3	6,0	2,0	45,5	23,0	4	156	1,84	0,24	4,5	61	1,39	443	0,50	30,0	5,3	5,8	42,6	29,4	12,5	0,35

N°	EXTRACTION DTPA ( <i>non tamponné</i> )										EXTRACTION KCl									
	Mn	Ni	Mg	Fe	Cr	Co	Al	K	Na	Zn	Mn	Ni	Co	Fe	Cr	Al	Mg	Na	Ca	
	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
1	962	31	117	72	0,5	97	51,6	21,3	20,8	2,1	5,91	3,05	0,01	0,04	0,03	0,04	25,4	1,51	73,1	
2	1089	56	72	90	0,6	67	61,0	19,6	20,0	2,4	9,80	15,68	0,01	0,00	0,12	0,68	12,1	0,12	15,0	
3	1427	313	332	161	0,8	116	58,9	53,1	47,4	8,7	7,70	38,60	0,01	0,37	0,01	0,12	48,3	1,02	125,5	
4	1146	118	191	125	0,5	60	109,3	36,6	35,1	5,3	61,59	60,98	0,05	0,11	0,09	2,28	34,2	0,77	33,7	
5	957	64	139	85	0,6	56	74,0	34,1	32,2	4,2	19,99	13,24	0,01	0,19	0,12	0,14	23,8	0,77	61,3	
6	1055	45	98	86	0,7	54	108,5	26,5	19,3	1,0	13,57	15,28	0,02	0,53	0,25	0,65	17,3	0,10	15,7	
7	1088	106	188	90	0,5	76	53,8	50,0	28,9	3,5	83,64	40,27	0,22	0,03	0,10	0,23	52,6	1,72	107,8	
8	899	80	129	153	0,6	67	47,1	29,3	26,9	0,5	19,57	25,55	0,13	0,02	0,14	0,13	27,1	0,64	43,5	
9	1052	145	242	60	0,4	74	42,4	62,7	34,1	4,9	4,39	3,87	0,00	0,04	0,00	0,04	41,2	0,58	183,4	
10	837	116	139	170	0,7	62	164,3	31,0	32,1	6,1	52,85	78,94	0,31	0,07	0,04	2,72	32,3	1,08	28,7	
11	578	57	288	101	0,4	63	75,2	68,4	39,9	4,3	3,22	0,95	0,01	0,05	0,00	0,03	61,5	1,46	217,3	
12	397	40	214	70	0,7	74	57,3	48,6	21,4	1,3	2,76	1,34	0,02	0,00	0,06	0,06	39,4	0,18	144,9	

COMPLEXE ECHANGEABLE (acétate d'ammonium N pH 7)												
N°	Ca mé/‰	Mg mé/‰	Na mé/‰	K mé/‰	Fe mg/kg	Mn mg/kg	Co mg/kg	Ni mg/kg	Cr mg/kg	Al mg/kg	Zn mg/kg	CEC mé/‰
1	1,9	1,0	0,1	0,1	0,7	2,2	0,0	1,7	1,1	1,1	0,0	10,6
2	0,6	0,8	0,1	0,1	1,2	1,7	0,0	7,2	5,5	1,1	0,0	14,7
3	5,0	3,1	0,2	0,2	0,6	3,2	0,0	36,8	0,5	0,5	28,1	21,1
4	1,1	2,2	0,2	0,2	1,2	26,4	0,0	28,6	2,2	2,2	0,0	24,6
5	2,0	1,3	0,1	0,1	0,7	5,5	0,0	7,2	5,5	1,1	0,0	15,6
6	0,4	1,0	0,1	0,1	1,8	2,2	0,0	6,1	8,8	1,1	0,0	15,4
7	4,4	2,9	0,2	0,2	1,2	8,3	0,0	12,7	1,1	0,6	0,0	19,6
8	5,2	2,1	0,1	0,2	1,8	1,7	0,0	2,8	1,7	1,1	0,0	15,7
9	1,1	0,9	0,1	0,2	2,9	3,3	0,0	3,3	4,4	1,7	0,0	12,7
10	1,4	1,0	0,1	0,1	2,6	38,0	0,5	11,0	2,0	0,5	0,0	13,8
11	5,3	2,1	0,1	0,1	2,9	1,1	0,0	2,8	1,1	0,6	0,0	13,3
12	5,7	2,7	0,1	0,2	2,3	9,4	0,6	5,5	1,1	0,6	0,0	14,4

EXTRAITS AQUEUX 1/5 - 5g/100 ml Solution acidifiée (2 gouttes HNO3 ds ± 7 ml) avant passage ICP																						
N°	pH	EC µS/cm	Cl mé/l	SO4 mé/l	NO3 mé/l	somme anions	somme cations	Ca mé/l	Mg mé/l	Na mé/l	K mé/l	Al mg/l	Fe mg/l	Cu µg/l	Co µg/l	Cr µg/l	Mn mg/l	Ni µg/l	P µg/l	Si mg/l	Ti mg/l	Zn µg/l
1	4,25	42	0,11	0,14	0	0,25	0,27	0,03	0,06	0,13	0,04	0,15	0,94	4,9	16,5	12,1	0,18	28,3	0,0	4,9	0,0	79,7
2	4,12	36	0,13	0,09	0,01	0,23	0,18	0,00	0,03	0,11	0,04	0,04	0,00	4,3	6,7	11,4	0,16	21,7	0,0	5,9	0,0	59,8
3	4,35	39	0,16	0,05	0,01	0,22	0,31	0,04	0,07	0,16	0,03	1,32	10,90	5,8	64,2	118,2	0,80	360,9	0,0	12,0	0,0	36,6
4	4,23	45	0,17	0,09	0	0,26	0,26	0,02	0,04	0,14	0,05	0,17	0,31	11,9	61,9	5,4	1,10	152,0	0,0	10,2	0,0	33,3
5	4,4	42	0,13	0,12	0	0,25	0,26	0,02	0,04	0,15	0,05	0,05	0,07	6,6	13,1	10,8	0,29	20,8	0,0	5,4	0,0	37,7
6	4,37	37	0,14	0,08	0	0,22	0,21	0,01	0,04	0,11	0,06	0,04	0,17	2,8	6,1	13,4	0,19	18,1	0,0	6,9	0,0	15,9
7	4,7	40	0,12	0,06	0	0,18	0,31	0,04	0,07	0,16	0,03	0,59	4,47	9,4	56,5	58,9	0,99	156,6	0,0	10,0	0,0	22,3
8	5,05	39	0,12	0,08	0,01	0,21	0,32	0,05	0,07	0,15	0,05	0,28	1,28	5,2	49,9	20,8	0,89	66,7	0,0	5,4	0,0	12,2
9	4,45	56	0,17	0,18	0	0,35	0,30	0,02	0,04	0,17	0,07	0,12	0,11	2,0	30,9	19,1	0,57	16,8	0,0	6,7	0,0	14,2
10	4,6	56	0,19	0,14	0	0,33	0,38	0,04	0,07	0,19	0,07	0,35	0,88	13,8	39,0	23,5	0,69	77,9	0,0	7,4	0,0	24,5
11	5,17	43	0,11	0,11	0	0,22	0,35	0,06	0,08	0,14	0,07	0,22	0,28	15,6	32,8	11,0	0,41	56,1	0,0	7,1	0,0	31,6
12	4,96	74	0,21	0,2	0	0,41	0,59	0,08	0,17	0,17	0,17	0,29	1,18	6,1	12,5	29,1	0,19	56,8	0,0	4,6	0,0	15,3

## Annexe 2.2. Concentration moyenne en potassium (g/100g), en magnésium (g/100g) et en nickel (mg/kg) dans les différents organes de *Costularia comosa*

Concentrations en potassium dans les différents organes de *Costularia comosa* en fonction des 9 traitements

NB : Les différentes lettres à côté des données de moyennes indiquent les différences significatives au vu du test de

Concentration de K dans les tissus (g/100g)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	0,262 a	0,306 a	0,258 a	0,186 a	0,204 a	0,310 a	0,162 a	0,296 a	0,268 a
	Ecart type (+/-)	0,096	0,162	0,084	0,032	0,067	0,112	0,066	0,054	0,109
Foliaires	Moyenne	0,744 a	0,666 a	0,696 a	0,738 a	0,72 a	0,632 a	0,652 a	0,634 a	0,624 a
	Ecart type (+/-)	0,079	0,076	0,102	0,060	0,135	0,064	0,053	0,047	0,065
Hampes	Moyenne	0,414 a	0,424 a	0,266 a	0,390 a	0,320 a	0,338 a	0,340 a	0,352 a	0,296 a
	Ecart type (+/-)	0,160	0,042	0,085	0,130	0,092	0,112	0,108	0,094	0,072

comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)

Concentrations en magnésium dans les différents organes de *Costularia comosa* en fonction des 9 traitements

NB : Les différentes lettres à côté des données de moyennes indiquent les différences significatives au vu du test de

Concentration de Mg dans les tissus (g/100g)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	0,214 a	0,198 a	0,188 a	0,188 a	0,194 a	0,182 a	0,190 a	0,192 a	0,188 a
	Ecart type (+/-)	0,017	0,019	0,016	0,026	0,009	0,027	0,041	0,016	0,008
Foliaires	Moyenne	0,076 a	0,076 a	0,074 a	0,076 a	0,078 a	0,084 a	0,072 a	0,082 a	0,082 a
	Ecart type (+/-)	0,013	0,013	0,009	0,013	0,008	0,011	0,011	0,013	0,008
Hampes	Moyenne	0,066 a	0,076 a	0,066 a	0,064 a	0,072 a	0,08 a	0,07 a	0,076 a	0,078 a
	Ecart type (+/-)	0,005	0,015	0,017	0,005	0,022	0,016	0,012	0,009	0,008

comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)

Concentrations en nickel dans les différents organes de *Costularia comosa* en fonction des 9 traitements

NB : Les différentes lettres à côté des données de moyennes indiquent les différences significatives au vu du test de

Concentration de Ni dans les tissus (mg/kg)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	196,2 a	197,8 a	231,2 a	227,6 a	237,6 a	227 a	206,6 a	212,8 a	246 a
	Ecart type (+/-)	48,1	83,6	99,4	70,4	65,3	75,0	42,4	69,1	66,0
Foliaires	Moyenne	25,8 a	19,2 a	28,6 a	20,6 a	24,6 a	23,4 a	26 a	23,4 a	23 a
	Ecart type (+/-)	8,1	3,7	6,3	3,3	9,9	6,3	3,1	9,3	5,2
Hampes	Moyenne	19,2 a	17,8 a	25,8 a	31,8 a	23 a	23,2 a	22,4 a	25,8 a	26,2 a
	Ecart type (+/-)	9,7	4,3	9,5	26,3	6,4	9,7	3,5	7,2	4,1

comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)

**Annexe 2.3.** Quantités de potassium et de magnésium (mg/plante, rapporté à la matière sèche) par plante dans les différentes parties de *C. comosa*, en fonction des 9 traitements de fertilisation

Quantités de potassium (mg/plante, rapporté à la matière sèche) par plante dans les différentes parties de *C. comosa*, en fonction des 9 traitements de fertilisation

Quantité de K dans les parties (mg/plante)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	19,6 a	29,3 ab	29,3 ab	17,7 a	25,7 ab	65,2 b	12,7 a	41,0 ab	81,3 b
	Erreur standard (+/-)	14,4	19,7	15,0	12,8	16,7	12,0	10,8	14,4	56,4
Foliares	Moyenne	116,2 a	143,4 a	186,7 a	173,5 a	175,5 a	213,2 a	201,2 a	174,9 a	236,5 a
	Erreur standard (+/-)	44,3	66,5	129,5	90,9	133,2	87,8	136,1	93,7	170,1
Hampes	Moyenne	23,6 a	19,5 a	25,0 a	30,0 a	42,8 a	56,3 a	22,4 a	56,9 a	79,7 a
	Erreur standard (+/-)	14,3	8,9	24,6	28,3	42,3	46,7	21,8	39,8	34,2
Totale	Moyenne	159,3 a	192,2 a	240,9 a	221,2 a	244,1 a	334,7 a	236,3 a	272,9 a	397,5 a
	Erreur standard (+/-)	63,2	92,1	165,1	103,9	160,7	122,3	171,2	119,4	237,6

NB : Les différentes lettres à côté des données de moyennes, indiquent les différences significatives au vu du test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)

Quantités de magnésium (mg/plante, rapporté à la matière sèche) par plante dans les différentes parties de *C. comosa*, en fonction des 9 traitements de fertilisation

Quantité de Mg dans les parties (mg/plante)		N0P0	N0P1	N0P2	N1P0	N1P1	N1P2	N2P0	N2P1	N2P2
Racinaires	Moyenne	13,9 a	19,0 a	23,4 a	17,0 a	23,3 a	44,8 ab	13,8 a	27,4 a	55,2 b
	Erreur standard (+/-)	7,6	12,1	14,9	11,8	10,8	23,0	7,7	9,8	23,2
Foliares	Moyenne	11,5 a	15,7 a	21,6 a	16,2 a	20,2 a	27,4 a	22,9 a	23,1 a	31,4 a
	Erreur standard (+/-)	3,6	6,3	15,3	7,8	19,4	8,4	15,7	13,2	23,5
Hampes	Moyenne	4,0 ab	3,6 a	6,1 ab	4,9 ab	8,1 ab	11,8 ab	5,3 ab	11,9 ab	22,5 b
	Erreur standard (+/-)	2,5	1,7	5,7	3,1	0,7	5,2	5,0	6,9	13,4
Totale	Moyenne	29,5 a	38,3 ab	51,1 ab	38,2 ab	51,7 ab	84,1 b	42,1 ab	62,3 ab	109,1 b
	Erreur standard (+/-)	10,1	16,7	35,3	18,2	30,6	31,0	27,6	26,6	55,1

NB : Les différentes lettres, à côté des données de moyennes, indiquent les différences significatives au vu du test de comparaison des 9 moyennes (Kruskal-Wallis). Moyennes réalisées sur 15 échantillons par traitement de fertilisation (correspondant à 3 individus par placette \* 5 répétitions)





# **CHAPITRE 3. New insights into the mycorrhizal behaviour of Cyperaceae. Role of arbuscular mycorrhizas in growth and adaptation of *Costularia comosa* in New Caledonian ultramafic soils**

**Authors:** Alexandre LAGRANGE<sup>1, 2</sup>, Marc DUCOUSSO<sup>2, 3</sup>, Philippe JOURAND<sup>2</sup>, Clarisse MAJOREL<sup>2, 4</sup>, Hamid AMIR<sup>1</sup>

In memory of late Dr Nicolas PERRIER

<sup>1</sup>Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement, Université de la Nouvelle-Calédonie, BPR4, 98851 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie.

<sup>2</sup>Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113 Agro-M/CIRAD/INRA/IRD/UM2, BPA5, 98 848 Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

<sup>3</sup>Institut Agronomique néo-Calédonien, BP A5, 98 848 Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

<sup>4</sup>Plate-Forme du vivant de Nouvelle-Calédonie, BPA5, 98 848 Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

**Key words:** Arbuscular mycorrhizas, Cyperaceae, ultramafic soil, New Caledonia, nickel.

## Abstract

Cyperaceae was first recognized as a non-mycorrhizal plant family, but later investigations demonstrated that some members of this family can form mycorrhiza. The aim of the study was to highlight the symbiotic status of Cyperaceae and to bring new insights into the role of this symbiosis in ultramafic soils.

A survey of arbuscular mycorrhizal (AM) colonisation using microscopic observations was conducted on Cyperaceae from New Caledonia ultramafic soils. In a second step, a controlled inoculation assay was set up with *Costularia comosa* to study the role of AM in plant growth in ultramafic soil.

The nine species of Cyperaceae collected in natural ultramafic environment present evidence of AM colonisation with frequencies ranging from 8 to 57 %. We obtained molecular evidence demonstrating the presence of a *Glomus* sp. in the field-collected root of *Costularia comosa*. In controlled greenhouse assay, AM inoculation significantly increases plant survival and growth, and reduces nickel content in roots by 2.5 fold, suggesting a role of AM as a barrier for nickel uptake.

In this study we show that Cyperaceae of New Caledonia present weak AM colonisation that might have a positive impact on plant survival and growth in ultramafic soils.

## 3.1. Introduction

Mycorrhizal symbiosis associates nearly all terrestrial plants to different types of fungi (Brundrett 1991, 2009; 2002) and leads some authors to state that symbiosis represents the normal status of a plant (Fitter and Moyersoen 1996). However, some plant families such as Cyperaceae (Nadarajah and Nawawi 1988; Powell 1975; Tester et al. 1987), Haemodoraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae and Papaveraceae, are considered not or only weakly mycorrhizal (Wang and Qiu 2006). Several studies reported arbuscular mycorrhizal (AM) associations within Cyperaceae, also called sedges, suggesting that some species of this family are able to form mycorrhizas (Gai et al. 2006; Harrington and Mitchell 2002; Lamont 1982; Lovera and Cuenca 1996; Meney et al. 1993; Miller et al. 1999; Muhtukumar et al. 1996; Perrier et al. 2006a). Mycorrhizal structures mostly observed in sedge colonisation correspond to intracortical hyphae and *Glomus*-type vesicles (Muthukumar et al. 2004; Perrier et al. 2006a). Furthermore, the analysis of the

mycorrhizal status from 23 species of *Carex* growing in either waterlogged or dryer ecosystem reveals that mycorrhizal association depends on both environmental condition and phylogenetic traits (Miller et al. 1999).

In New Caledonia, about 1/3 of the main island soils result from the natural weathering of ultramafic rocks (Perrier et al. 2006b) since the last upheaval of the island from the ocean 30 million years ago, under a tropical climate recognized as stable over time. These soils are mainly formed of iron oxides, present high concentration of heavy metals (Ni, Cr, Mn and Co), a low content in major nutrients (N, P and K) and an unbalanced Ca/Mg ratio (Latham 1985). These factors, responsible for the serpentine syndrome, have contributed to the diversification of plant nutrient acquisition strategies such as cluster roots and mycorrhizal symbiosis (Brady et al. 2005).

These specific ecosystems are characterised by a high percentage (> 75%) of endemic plant species (Jaffré et al. 2001; Myers et al. 2000). Cyperaceae are considered as the main pioneer plants of ultramafic maquis, where they almost exclusively compose the herbaceous stratum (Jaffré 1992). This status of pioneer plants suggests that Cyperaceae in New Caledonia have acquired adaptation mechanisms for improved nutrition and probably for limiting heavy metal toxicity. Arbuscular mycorrhizal structures were observed at low intensity in 3 Caledonian sedge species (Perrier et al. 2006a) suggesting they might contribute to the adaptation mechanism. However, we still don't know if the low level of root colonisation leads to an efficient mutualistic association between Cyperaceae and if AM have an impact on plant growth and survival.

The aim of the study was to highlight the symbiotic behaviour of Cyperaceae in New Caledonia ultramafic soils. For this purpose, we investigated the occurrence of mycorrhizal colonisation of nine Cyperaceae species from New Caledonian ultramafic maquis ecosystems by microscopic observation to quantify the presence of AM structures within roots. We also perform a molecular analysis to identified fungi associated with sedges. The relationships between the extent of AM colonization and plant growth, plant survival and nutrient status were assessed in greenhouse experiments using *Costularia comosa* (C.B. Clarke) Kük, one of the most frequent cyperaceous species found in New Caledonia ultramafic soils.

## 3.2. Materials and methods

### 3.2.1. Sites Survey

Four sites located in ultramafic ligno-herbaceous maquis ecosystems have been chosen for this study. Site 1 is located in Plum area (22° 16'59" S; 166° 39'12" E) on colluvial lateritic soil. Site 2, also composed of colluvial lateritic soil, is located on the Koniambo massif (21° 00'39" S; 164° 49'08" E). Site 3 is located in the Plaine des lacs region (22° 13'06" S; 166° 52'49" E) on alluvial lateritic soil. Site 4 is located in Prony area (22° 19'28" S; 166° 49'25" E) on nodular ferrallitic soil. Soils present in these four sites are highly weathered oxisols (Latham 1985; Perrier et al. 2006b); total iron (Fe) concentration ranging from 290 to 535 g kg<sup>-1</sup> and DTPA-extractible Fe concentrations ranging from 81 to 238 mg kg<sup>-1</sup>. The three other main characteristics of these slightly acidic soils (pH 5.2-6.1) are a strong deficiency in phosphorus and potassium ( $P_{\text{total}}$  64-86 mg kg<sup>-1</sup>,  $P_{\text{Olsen}}$  1-5 mg kg<sup>-1</sup>, K 20-84 mg kg<sup>-1</sup>), an unbalanced calcium to magnesium ratio (Ca 0.1-1.5 g kg<sup>-1</sup>, Mg 3.1-88.4 g kg<sup>-1</sup>) and high content of putatively toxic heavy metals (Ni 3.2-6.5 g kg<sup>-1</sup>, Cr 12.7-22.8 g kg<sup>-1</sup>, Mn 5.2-11.0 g kg<sup>-1</sup>, Co 0.4-1.1 g kg<sup>-1</sup>), with DTPA-extractible concentrations as follow: Ni 0.2-2.4 mg kg<sup>-1</sup>, Co 0.3-0.6 mg kg<sup>-1</sup>, Cr 0-0.8 mg kg<sup>-1</sup>, Mn 0.9-1.1 mg kg<sup>-1</sup> (Perrier et al. 2006a). Sedge species present in each site has been identified according to morphological features using the Noumea Herbarium, New Caledonia (Nou).

### 3.2.2. Plant root sampling for microscopic observation and molecular analysis

One to 5 g (fresh weight) of thin roots are fixed in fixing solution (33% Ethanol, 33% Glycerol and 33% water). The survey took place during the rainy season from January to April during 3 consecutive years (2006 to 2008). Root identity was ascertained by tracing from the clump to the root tips. For each sedge species, 8 independent plants were randomly sampled. The presence of lateral swollen dauciform roots was directly observed by visual examination in the field and later confirmed by stereomicroscope observation in the laboratory.

### 3.2.3. Staining, observation and characterization of root fungal colonisation

Roots were stained with Trypan blue (Koske and Gemma 1989) to assess the presence of arbuscular mycorrhizal colonisation. For each individual sample, at least 25 root segments of 1cm length were mounted in 10% glycerol on glass slides for examination with a light microscope. A root segment was considered to be mycorrhized when arbuscules, vesicles or hyphal coils were clearly identified. The frequency percentage of arbuscular mycorrhizal colonisation (F%) and the intensity percentage of arbuscular mycorrhizal colonisation (M%) were determined according to Trouvelot et al. (1986).

### 3.2.4. Molecular and phylogenetic analyses

For molecular analyses, a total of 160 thin roots fragment were sampled from 5 individual clump of *Costularia comosa* (80 fragments), *C. nervosa* (40 fragments) and *C. pubescens* (40 fragments) growing on the site 1. Their mycorrhizal colonisation was controlled under microscope.

Total genomic fungal DNA was extracted from root fragments using the DNAeasy Plant Qiagen Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). An approximately 550-bp partial fragment of the DNA region encoding for 18S small subunit rDNA (SSU) was amplified with primers AM1 (5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3') (Helgason et al. 1998) and NS31 (5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') (Simon et al. 1992). PCR reactions were performed as previously described by Helgason et al. (1999). PCR products were analysed by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gel containing ethidium bromide. For DNA sequencing, PCR products were purified using the Qiagen Gel extraction Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and sequences obtained using Big Dye Terminator chemistry and ABI3730 capillary electrophoresis-based genetic analyzer (Macrogen, Seoul, Korea). All sequences were then deposited in the EMBL nucleotide database for assignment of accession numbers that are further reported.

### 3.2.5. Greenhouse experiment

*Costularia comosa* was chosen in the present study because we found this species to be very frequently mycorrhized with a high mycorrhizal index. In addition, seeds of *C. comosa* were easily available with a germination rate higher than 50%.

Seeds of *Costularia comosa* were sown in sterilized sand and grown for one month before the transfer of young plants into plastic pots (0.6 L) containing a sterilized (autoclaved for 30 min; 120°C) mixture of sieved (2 mm) lateritic topsoil from site 1 (5 V) and commercial compost (N 1.7 mg g<sup>-1</sup>, P<sub>total</sub> 150 mg kg<sup>-1</sup>, P<sub>Olsen</sub> 7 mg kg<sup>-1</sup>, K 139 mg kg<sup>-1</sup>: Terreau universel, Agrofino, France) (1 V). Plants were cultivated for twelve months under greenhouse conditions (15-25°C, daily watering to field capacity, with partial shading).

Two different arbuscular mycorrhizal inoculums were prepared as follow. (1)- Strain SFONL (*Glomus etunicatum*) originally isolated from the rhizosphere of *Alphitonia neocaledonica* (Rhamnaceae) in a lateritic soil located at Ouenarou, New Caledonia (22° 10'26" S; 166° 44'24" E), was maintained via trap culture on sorghum; this strain is known for its capacity to promote plant growth (*Alphitonia neocaledonica*, *Xanthostemon multiflorus* and *Cloeziartensis*) under greenhouse conditions (Amir and Lagrange 2008). A partial 18S SSU-rDNA sequence of this strain is available under accession number FM997956. *Costularia comosa* inoculation with SFONL strain was realized by coating one-month-old root with 5 ml of a suspension containing ca. 170 spores, during transfer into the plastic pots. (2)- Spores from the rhizosphere of *Costularia comosa* from site 1 were isolated (wet-sieving and decanting method) together with young roots to prepare a "Natural inoculum". This inoculum consists in a 5 ml suspension of crushed roots (ca. 250 mg) containing ca. 115 spores and was used as previously described to inoculate *C. comosa*.

Thirty *C. comosa* were inoculated with either SFONL strain, the Natural inoculum or distilled water as negative control and grown in individual pots randomly distributed in the greenhouse. To ascertain the effect of these two mycorrhizal treatments, 30 sorghum plants, a highly mycotrophic species used as positive control, were treated in the same conditions and grown for 12 weeks.

*Costularia comosa* survival rates were measured after 2, 8 and 12 months of growth. After 12 month, the number and length of leaves and dry weights of both leaves and roots were measured. N, P, K and Ni contents in leaves and roots were quantified at the chemistry laboratory of IRD (LAMA IRD Noumea) as described in Perrier et al. (2006a). The percentage of arbuscular mycorrhizal colonisation (F) and the intensity of arbuscular mycorrhizal colonisation (M) were determined according to Trouvelot et al. (1986).

Means comparison analysis between treatments and for each parameters and analysis of correlation between the different parameters was carried out using Kiplot V2.0 beta 13 statistic software.

### 3.3. Results

#### 3.3.1. Field mycorrhizal survey

The nine different species of sedges growing were collected (8 independent specimen each) during the rainy season spanning from January to April on each site. The frequency of arbuscular mycorrhizal colonisation (F%) and the intensity of arbuscular mycorrhizal colonisation (M%) of each examined species are presented in Table 3.1. Among the five genera studied, *Costularia*, present on these four study sites, was found to be the most strongly and evenly mycorrhizal (F% = 32.4% and M% = 5.8%), and did not show changes in mycorrhizal frequency and intensity between the four sites. In contrast, genera *Baumea* and *Schoenus* present a weak arbuscular mycorrhizal colonisation (F% = 6.1% and M% = 1.4%).



**Table 3.1.** Frequency (F%)\* and intensity (M%)\* of arbuscular mycorrhizal colonisation within 9 sedge species collected in the field from 4 different ligno-herbaceous maquis ( $\pm$ SD: standard deviation)

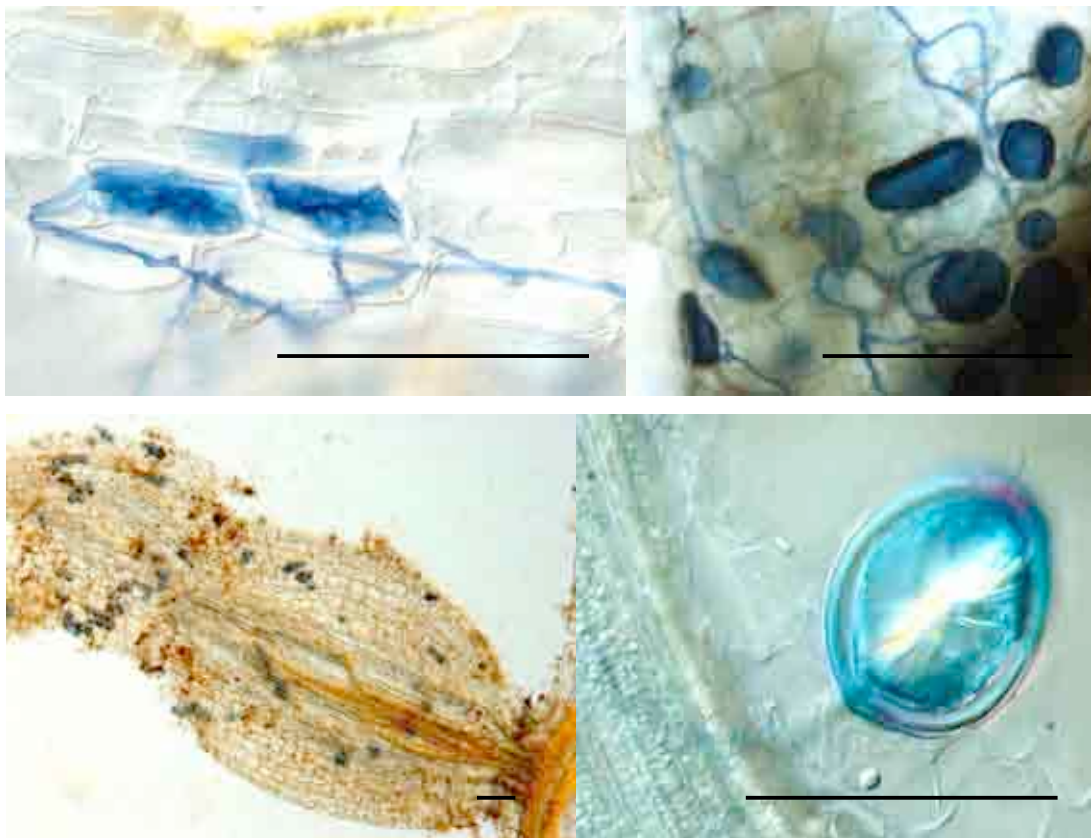
Species		F %	M %
<i>Baumea deplanchei</i> Boeck	Site 1	7.9 $\pm$ 5.1	2.6 $\pm$ 2.1
	Site 4	0	0
<i>Costularia arundinacea</i> Kuek	Site 3	43.2 $\pm$ 16.1	6.7 $\pm$ 4.2
<i>Costularia comosa</i> (C.B.Clarke) Kük	Site 1	29.3 $\pm$ 10.4	6.2 $\pm$ 3.1
	Site 2	21.5 $\pm$ 12.2	1.6 $\pm$ 1.1
<i>Costularia nervosa</i> Raynal	Site 1	32.6 $\pm$ 13.4	7.3 $\pm$ 3.9
	Site 3	57.1 $\pm$ 23.7	11.8 $\pm$ 5.8
	Site 4	22.2 $\pm$ 11.8	3.8 $\pm$ 2.7
<i>Costularia pubescens</i> Raynal	Site 1	28.3 $\pm$ 9.8	5.2 $\pm$ 3.1
	Site 4	25.0 $\pm$ 16.8	3.8 $\pm$ 2.0
<i>Gahnia aspera</i> (R.Br.) Spreng	Site 4	18.1 $\pm$ 8.9	3.1 $\pm$ 1.8
<i>Lepidosperma perteres</i> C.B. Clarke	Site 3	24.2 $\pm$ 14.8	3.8 $\pm$ 2.5
	Site 4	16.7 $\pm$ 7.2	2.1 $\pm$ 1.7
<i>Schoenus juvenis</i> C.B.Clarke	Site 1	10.0 $\pm$ 7.8	6.1 $\pm$ 4.7
	Site 4	19.7 $\pm$ 13.9	2.7 $\pm$ 1.8
<i>Schoenus neocaledonicus</i> C.B. Clarke	Site 1	8.7 $\pm$ 6.1	0.7 $\pm$ 0.6
	Site 4	8.1 $\pm$ 5.9	2.1 $\pm$ 1.8

\* F (%) = (number of mycorrhizal root fragments/total number of root fragments)\*100

M (%) = (95n5 + 70n4 + 30n3 + 5n2 + n1)/(total number of root fragments)

(where n5 is the number of root fragments with more than 90% colonisation, n4 between 90 and 50% colonisation, n3 between 50 and 10% colonisation, n2 between 10 and 1% colonisation and n1 less than 1% colonisation)

The most frequently observed mycorrhizal structure was long strait hyphae following the root cortex in its length. We also observed, although with a lower frequency, *Glomus*-type vesicles with a sub-spherical shape eventually compressed against the cell wall (Fig. 3.1B). Extra-radical spores and intra cellular arbuscules have also been observed (Fig. 3.1A, 3.1D). All 136 examined specimens had developed dauciform roots, showing for some of them evidence of arbuscular mycorrhizal colonisation (Fig 3.1C).



**Figure 3.1.** Microscopic observation of arbuscular mycorrhizas in *Costularia comosa* after staining with Trypan blue (Koske and Gemma 1989) and mounting in 10 % glycerol. A: arbuscules observed in a plant inoculated by strain SFONL; B: *Glomus*-type Vesicles in the cortex of plant root; C: infection by arbuscular mycorrhizas in a dauciform root. D: Spore intraracinaire de *Glomus* sp. The bare represent 50 µm

### 3.3.2. Molecular identification of a *Glomus* associated with AM in Cyperaceae

We isolated DNA from 160 root samples from *Costularia comosa*, *C. nervosa* and *C. pubescens*, but only obtained PCR product for 10 of them using AM1 and NS31 primers to amplify 18S small subunit rDNA region. The direct sequencing of these 10 PCR products revealed one unique sequence showing strong homologies to *Glomus* group B (Schüssler et al. 2001) closely related to *Glomus etunicatum*, *G. claroideum* and to the SFONL strain used in this study. The sequence has been deposited in EMBL nucleotide database under accession number FM997957. So far, our molecular analysis of AM associated with Cyperaceae was probably limited by

the low frequency and intensity of root colonisation preventing PCR amplification of fungal rDNA from most of our samples. However, the sequence we obtained is the first molecular proof, to our knowledge, of the presence of *Glomus* into the root of a Cyperaceae.

### 3.3.3. Effects of AM inoculation on *Costularia comosa* root colonisation, survival, growth and N, P, K and Ni contents

The analysis of AM colonisation of Sorghum, used as positive control, revealed that all the analysed root fragments were mycorrhized by Natural or SFONL inoculum, with mycorrhizal intensity value (M%) of  $37\% \pm 9$  and  $60\% \pm 13$  respectively. In contrast, non-inoculated Sorghum plants were never found to be mycorrhized. This result indicates that our inoculum protocol and growth conditions allow an efficient plant mycorrhization. *Costularia comosa* inoculated with SFONL strain showed fungal root colonisation frequency value (F%) of  $62\% \pm 17$  and intensity value (M%) of  $5\% \pm 1.5$ . In contrast, non-inoculated control *C. comosa* showed F and M value of  $12.7\% \pm 11$  and  $1\% \pm 1.6$  respectively, which are significantly different (K. Wallis Test,  $P \leq 0.05$ ) from inoculated roots by SFONL (Table 3.2). The low AM colonisation in control experiments concerned only few plants as showed by the high standard deviations, and can be the consequence of some spores that were not destroyed during the sterilisation of the substrate; however significant difference is observed between SFONL treatment and control. Natural inoculum led to an intermediate mycorrhization with F and M value of  $31\% \pm 13$  and  $1.7\% \pm 0.9$  respectively. As observed *in situ*, AM colonisation was weak and structures mainly correspond to extra and intra cortical arbuscular mycorrhizal hyphae and *Glomus*-type vesicles. Occurrence of vesicles was higher with SFONL strain. Intracellular arbuscules or hyphal coils were rarely observed with the two inoculation treatments.

**Table 3.2.** Dry weight (g) and N, P, K and Ni contents ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) of shoots and roots of *Costularia comosa* inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungi (natural inoculum or strain SFONL)

	Control		Natural inoculum		SFONL strain	
F%	12.7 $\pm$ 11 a*		31 $\pm$ 13 ab		62 $\pm$ 17 b	
M%	1 $\pm$ 1,6 a		1.7 $\pm$ 0.9 ab		5 $\pm$ 1.5 b	
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
Dry weight (g)	0.089 a	0.106 a'	0.171 a	0.157 a'	0.308 b	0.238 b'
N ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	8600 a	4200 a'	8800 a	4130 a'	8300 a	3730 a'
P ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	433 a	253.5 a'	386 a	236 a'	415 a	232.3 a'
K ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	12350 a	3450 b'	11233 a	3400 b'	12430 a	5160 a'
Ni ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	21.5 a	1789 a'	32 a	1239 b'	21.6 a	718 c'

\* Number followed by the same letter for each AM colonisation parameter, each element and plant part dry weight (shoot or root) are not significantly different at  $P \leq 0.05$

The survival rates were different depending on inoculation treatments with 42%, 58% and 70% respectively for control, Natural inoculum and strain SFONL treatments. We also observe that survival rates reached stable values 6 months after the beginning of the assay suggesting that mycorrhization has a positive impact on the early stage of *C. comosa* growth. We then analysed the effect of mycorrhization on plant growth parameter. SFONL inoculation increased root and shoot dry weight. Using a Parametric Multiple Comparisons (Tukey-Kramer Test) we confirmed that these values are significantly different ( $P \leq 0.05$ ) from non-inoculated plants for leaves number and size. However, this test failed to reveal a significant difference between Natural inoculum and non-inoculated control. This might be due to the weak mycorrhization obtained with natural inoculum compared to control. Therefore, we directly tested the correlation between growth parameters and mycorrhization parameters. Table 3.3 shows significant correlation between mycorrhization and all the growth parameters.

**Table 3.3.** Analyses of linear total correlations between mycorrhizal frequency (F%), mycorrhizal intensity (M%) and growth parameters of *Costularia comosa* inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungi (Natural inoculum or strain SFONL)

	Number of leaves	Length of leaves	Shoot dry weight	Root dry weight
F%	0.455 <sup>***</sup>	0.496 <sup>***</sup>	0.511 <sup>***</sup>	0.417 <sup>**</sup>
M%	0.523 <sup>***</sup>	0.486 <sup>***</sup>	0.486 <sup>***</sup>	0.405 <sup>**</sup>

<sup>\*\*</sup> Significantly different for  $P \leq 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup> Significantly different for  $P \leq 0.001$

Potassium concentration increased (Tukey-Kramer Test,  $P \leq 0.05$ ) in roots of plants inoculated with SFONL. Potassium, nitrogen and phosphorus concentrations in shoot were not affected by SFONL or Natural inoculation (Table 3.2). However, it is important to notice that because SFONL inoculated plants had a higher dry weight, they also contained more N, P, K than control plants suggesting that AM colonisation participate to nutrient assimilation (Table 3.3). Furthermore, the nickel concentration in roots is also significantly reduced by 2.5 times in SFONL inoculated plants.

## 3.4. Discussion

### 3.4.1. New Caledonian Cyperaceae species are mycorrhized

Species belonging to the Cyperaceae family are generally considered not or weakly mycorrhizal (Powell 1975, Tester et al. 1987; Miller et al. 1999; Miller 2005). Our results demonstrate the presence of AM in the roots of 9 Cyperaceae species examined from New Caledonia ultramafic ligno-herbaceous maquis. These observations are in accordance with previous studies showing a weak colonisation of sedge roots by AM fungi forming more frequently intra-cortical hyphae and vesicles (Gai et al. 2006; Lamont 1982; Lovera and Cuenca 1996; Meney 1993; Muthukumar et al. 1996, 2004 and Perrier et al. 2006a). Indeed, AM colonisation frequency and intensity vary greatly between genera and species. For example *Costularia*, the most abundant sedge genus in the ligno-herbaceous ultramafic maquis, present the most developed AM colonization among the studied species.

Additionally, it was previously shown that environmental conditions and seasonality strongly influence AM colonisation (Muthukumar and Udaiyan 2002; Ruotsalainen et al. 2002; Li et al. 2005). Members of Proteaceae, Cyperaceae, and Restionaceae family that are usually considered as non or weakly mycorrhizal can form AM depending on the season, but the underlying physiological and ecological mechanism is still poorly understood (Bellgard 1991; Meney et al. 1993). Therefore, the analysis of the AM colonisation level along a whole year would allow to study the environmental impact on the capacity of sedge to associate with AM fungi on ultramafic soils.

### 3.4.2. Role of arbuscular mycorrhizas in *Costularia comosa*

These previous observations raise the question of the functional effect of AM colonisation on sedge survival and growth. Our results, obtained using plants grown in greenhouse, show that even a weak AM colonisation with a selected arbuscular mycorrhizal strain significantly improves *Costularia comosa* survival and growth. The effects of arbuscular mycorrhizal colonisation on *Costularia comosa* are supported by a highly significant positive correlation between plant growth and arbuscular mycorrhizal colonisation parameters. These results further suggest that these AM are functional in *Costularia comosa*. Experimental field assays which are in progress confirm the positive role of AM in *Costularia comosa* growth and seed production (unpublished).

Mycorrhizal inoculation generally improve plant growth leading to an increase of total phosphorus and nitrogen accumulated in each plant but does not impact on phosphorus and nitrogen concentrations in shoots and roots. The role of AM in potassium uptake is not well documented (Marschner 1995). George et al. (1992) show that hyphal structures contribute to about 10% of the total potassium in mycorrhizal *Agropyron repens*. The increase of potassium concentration observed in roots of *Costularia comosa* inoculated by SFONL suggests a similar role of this mycorrhizal strain.

The reduction of Ni toxicity resulting from AM colonisation was previously described to be the consequence of the binding by oxalates produced by fungus (Fomina et al. 2005) or the formation chitin-Ni complexes in the fungus cell wall (Franco et al. 2004; Zhou et al. 2005). The inoculation by SFONL strain significantly reduced Ni concentration in root suggesting a role of AM in nickel avoidance. While

the underlying mechanism is still not known, the protective effect of AM against Ni is probably one of the factor favouring the growth of mycorrhized plants on ultramafic soil (Leyval et al. 1997).

### **3.4.3. Multiple strategies of New Caledonian pioneer sedge to colonize an adverse environment**

Our study shows a beneficial effect of AM colonisation on *Costularia* development. We also observed that all samples of the nine sedges species studied under field conditions and all samples of greenhouse experiment developed dauciform roots. This root organ that belong to the so-called cluster roots, is characterized by lateral swelling that develop remarkably dense hairy root clusters (Davies et al. 1973; Lamont 1974, 1982; Shane et al. 2006).

Dauciform roots are mostly found in particular genera of the Cyperaceae family (Lambers et al. 2006), and only appear when plants grow on a low phosphorus soils (Miller 2005; Shane et al. 2005). These structures are considered as a plant adaptation to survive stressful soil conditions, notably P deficiency (Lambers 2008).

Therefore, New Caledonian sedge species developing on highly weathered ultramafic soil cumulate at least two adaptive structures favouring nutrient acquisition: arbuscular mycorrhizas and dauciform roots. The additional effects of these two adaptation strategies could be responsible for the Cyperaceae pioneer behaviour allowing plants to survive and to colonize bare soils. These results designate endemic Cyperaceae and AM management as potential tools for the improvement of mine site rehabilitation in New Caledonia.

### **Acknowledgements**

Authors greatly acknowledge SIRAS Pacific Company for providing a PhD grant to Alexandre Lagrange. Authors are also grateful to Valerie Medevielle, Cindy Pupier, Fabrice Doublet and David Maridas for their contribution to the lab work.







## **CHAPITRE 4. Caractérisation et sélection de rhizobactéries tolérantes au nickel chez deux espèces de *Costularia* pionnières des sols ultramafiques**

## 4.1. Introduction

La mise au point de méthodes pour améliorer la croissance des plantes sur les sols à revégétaliser passe par une meilleure connaissance des milieux et notamment des interactions sol-plante-microorganismes dans la rhizosphère (Marschner 1995). La rhizosphère est la zone d'échange entre le sol (minéraux, nutriment) et la plante (exudats racinaires, nutrition minérale), où la densité et la diversité des populations de microorganismes (champignons et bactéries) jouent un rôle majeur dans les flux de nutriments et donc dans la croissance et l'adaptation des plantes au milieu (Marschner 1995). Le chapitre précédent nous a instruit sur le rôle des champignons mycorhiziens arbusculaires sur la croissance des *Costularia*. Nous nous attacherons dans ce chapitre à décrire la diversité des rhizobactéries cultivables de deux espèces de *Costularia*, *Costularia nervosa* Raynal et *Costularia arundinacea* (Soland. ex Vahl) Kük., Cyperaceae endémiques et pionnières des formations de maquis "miniers" calédoniens. Dans ces environnements naturels, nos connaissances écologiques sur les communautés microbiennes rhizosphériques associées aux *Costularia* restent très fragmentaires (Amir et Pineau 1998 ; Mercky 1998).

Outre le manque de matières organiques, d'azote et de phosphore dans les sols des maquis miniers, la forte teneur en nickel biodisponible est l'une des caractéristiques à prendre en compte pour mesurer la capacité de la population bactérienne à croître dans les milieux ultramafiques. En effet, le nickel est considéré comme l'élément le plus toxique pour les organismes, comparativement aux autres éléments métalliques présents dans les sols ultramafiques calédoniens (L'Huillier et Edighoffer 1996 ; Nagy et Proctor 1997). La présence et la caractérisation des bactéries résistantes au nickel dans les milieux ultramafiques a fait l'objet de nombreuses études dans le monde et en Nouvelle-Calédonie (cf. synthèse bibliographique, paragraphe 3.2.4).

Plusieurs bactéries résistantes au nickel ont été bien étudiées et plusieurs déterminants moléculaires de résistance au nickel ont été identifiés. Les systèmes d'efflux du nickel les mieux identifiés chez les bactéries sont fondés sur les protéines transmembranaires *nreB* et *cnrA* issues des deux souches de *Ralstonia metallidurans* CH34 et 31A possédant respectivement dans leur génome les opérons *nre* (nickel résistance) et *cnr* (cobalt et nickel résistance) (Grass et al. 2001; Mergeay

2003 ; Nies 2003 ; Schmidt et Schlegel 1994 ). Les opérons *cnr* et *nre*, induits par le nickel, ne sont pas restreints au genre *Ralstonia*. On les retrouve aussi dans les genres *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, isolés de sites naturellement riches en nickel (Stoppel et Schlegel 1995). Chaintreuil et al. (2007) ont mis en évidence dans les sols calédoniens les deux déterminants génétiques de résistance au nickel *cnr* et *nre* chez des espèces de *Bradyrhizobium* isolées à partir de nodules de *Serianthes calycina*. La tolérance au nickel de la microflore bactérienne associée aux racines de *Costularia* n'a été explorée que très partiellement (Mercky et al. 1999). Les caractérisations écologiques et fonctionnelles des rhizobactéries résistantes au nickel, dont les métabolismes sont liés aux cycles de l'azote et du phosphore, pourront être le point de départ pour la sélection de bactéries bénéfiques au développement des *Costularia*, utilisables pour des essais de revégétalisation.

Par ses sécrétions racinaires, la plante est capable de changer la composition physique et chimique du sol rhizosphérique comparé au sol nu et ainsi favoriser la capacité de certaines bactéries à coloniser et prospérer à son contact (Griffiths et al. 1999 ; Lambers et al. 2009). La colonisation des racines par les bactéries n'est pas confinée au contact de celle-ci, mais peut également avoir lieu dans les tissus (apoplasme du cortex racinaire). Dans ce cas, le terme rhizobactérie endophyte est couramment employé (Kloepper et Beauchamp 1992). Certaines de ces rhizobactéries sont capables d'exercer un effet bénéfique sur la croissance de la plante grâce à des mécanismes divers (cf. synthèse bibliographique, paragraphe 3.2.1.3), elles sont regroupées sous le nom de PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) (Kloepper et Schroth 1978).

Dans les sols ferriques, le phosphore minéral est en faible concentration et se trouve principalement associé à la surface des oxydes et hydroxydes de Fer possédant une forte capacité de fixation des phosphates, les rendant ainsi peu disponible (Dubus et Becquer 2001). La solubilisation des phosphates de la rhizosphère par les bactéries PGPR est le mode d'action connu le plus commun impliqué dans l'augmentation de la disponibilité des nutriments pour la plante (Richarson 2001). Les souches provenant des genres *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium* sont connues pour être des solubilisatrices de phosphates efficaces (Rodriguez et Fraga 1999). Le mécanisme principal de solubilisation du phosphate est réalisé par l'action des acides organiques et des phosphatases, facilitant la

conversion des formes insolubles du phosphore en forme soluble biodisponible (Richardson et al. 2009). Ces acides organiques et ces phosphatases synthétisés et sécrétés par la cellule bactérienne dans leur environnement sont relativement courants chez les microorganismes rhizosphériques (Khan et al. 2007 ; Kim et al. 1998 ; Rodriguez et Fraga 1999). Les bactéries isolées dans nos travaux seront cultivées sur des milieux de culture décelant leur capacité à solubiliser les phosphates.

Les bactéries du sol sont les acteurs principaux du cycle de l'azote dans les écosystèmes naturels (Rick et Stuart 2001). Ce sont elles qui permettent l'entrée de l'azote dans le système (fixation de l'azote atmosphérique), ainsi que sa transformation (nitrification) et sa sortie (dénitrification). Ces réactions métaboliques font intervenir des enzymes présentes dans le génome de certaines bactéries. La fixation de l'azote atmosphérique ( $N_2$ ), réalisée par les bactéries possédant la nitrogénase (*Azotobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum*...), fournit la principale source d'azote dans les écosystèmes naturels (Burgess et Lowe 1996). Le but de notre démarche expérimentale est de mettre en évidence l'existence d'une entrée d'azote dans la rhizosphère des Cyperaceae et donc de détecter l'activité de l'enzyme nitrogénase.

L'objectif de cette étude est de caractériser la diversité de la flore bactérienne associée aux racines de deux espèces, *Costularia nervosa* et *Costularia arundinacea*, inféodées au maquis sur terrains ultramafiques et à large répartition du Nord au Sud de la Grande-Terre. Il s'agit aussi d'estimer les capacités adaptatives aux conditions ultramafiques (forte teneur en nickel) des bactéries rhizosphériques, ainsi que leur capacité à améliorer la nutrition azotée et phosphorée des plantes. La valorisation des rhizobactéries étudiées, par la validation de leur potentiel effet PGPR, pourra être précisée par la suite.

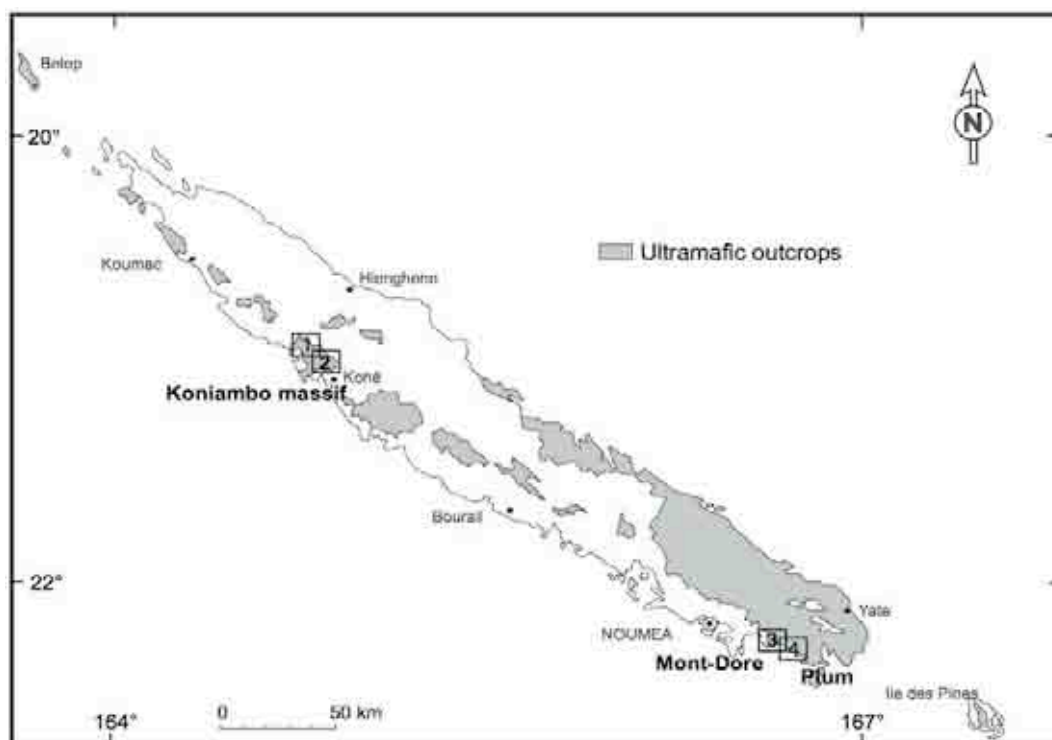
## 4.2. Matériels et Méthodes

Les stratégies de caractérisation des bactéries adoptées au cours de cette étude ont consisté à isoler des souches bactériennes cultivables à partir d'échantillons de racines broyées des deux espèces de *Costularia*. Les isolats ont été ensuite sélectionnés selon leur résistance au nickel, afin d'estimer la proportion de ces bactéries résistantes à cette contrainte édaphique. L'aptitude potentielle de ces

souches à améliorer la nutrition phosphatée des plantes a ensuite été estimée sur les bactéries isolées. Enfin, nous avons apprécié la diversité génétique des souches isolées par la méthode d'amplification ADNr 16S combiné avec un séquençage des fragments obtenus, suivi de comparaison par homologie de séquence avec le logiciel Blast-N. L'étude de la présence des déterminants moléculaires de résistance au nickel a été réalisée sur les souches afin d'étudier les relations entre la diversité taxonomique, la tolérance au nickel et la présence des déterminants de résistance au nickel de ces souches.

#### 4.2.1. Site d'étude

Les échantillons des deux espèces de *Costularia* à large répartition géographique ont été prélevés sur quatre sites de végétation de type maquis ligno-herbacés (Fig 4.1). Deux des quatre sites sont situés dans le Nord de la Grande-Terre sur le massif du Koniambo et les deux autres dans le Sud de l'île, à Plum et sur le massif du Mont-Dore (Tableau 1). Les quatre formations de maquis sont caractérisées par la présence d'une strate herbacée à *Costularia* spp. (Jaffré 1980) dont le recouvrement est supérieur à 50% et d'une strate arbustive basse composée d'espèces héliophiles et pionnières (McCoy et al. 1999).



**Figure 4.1.** Localisation des affleurements ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (en gris) avec la position des sites 1 et 2 dans le Nord et des sites 3 et 4 dans le Sud

### 4.2.2. Échantillonnages et référencement du matériel biologique

Trois échantillons de plantes sont prélevés pour chacune des espèces de *Costularia*, *C. arundinaceae* et *C. nervosa*, dans chacun des quatre sites. Les prélèvements ont été effectués dans des zones où les deux espèces sont présentes dans le même m<sup>2</sup> pour comparer leur population rhizobactérienne. Six plantes sont ainsi échantillonnées pour chacun des quatre sites, soit un total de 24 plants numéroté de 1 à 24. Les échantillons de sols des quatre sites sont prélevés directement à partir du sol adhérent aux racines. Les caractéristiques chimiques des sols ont été analysées par le Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA, IRD, Nouméa), les concentrations totales et extractibles des principaux métaux (extraits DTPA) et nutriments sont établies comme décrit dans Perrier et al. (2006) (N, P, K, Ca, Ni, Co, Mg, Fe). Quelques fragments de racines fines, d'environ 10 mm de long chacun, sont prélevés soigneusement sur chaque plante échantillonnée ; ils sont nettoyés et rincés abondamment avec de l'eau milli-Q stérile afin d'enlever toutes les particules de sol et d'avoir accès aux bactéries présentes sur et dans les racines (endobactéries). Les bactéries isolées à partir de ces fragments de racines sont référencées dans un abécédaire.

Après l'échantillonnage de quelques centimètres de racine fine pour chaque plant, les restes des 24 rhizosphères (24 plants plus 24 sols) sont placés séparément dans des bouteilles sérums pour effectuer les tests de mise en évidence de la fixation d'azote atmosphérique dans les différents échantillons par la méthode de réduction d'acétylène.

### 4.2.3. Mise en évidence de l'activité réductrice d'acétylène dans la rhizosphère de *Costularia*

Cette enzyme permet la réduction de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) en ammoniacque (NH<sub>3</sub>) et également celle de l'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) en éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) (Postgate 1972). Le principe est de mesurer l'activité réductrice d'acétylène effectué par les nitrogénases potentiellement présentes dans le génome des bactéries rhizosphériques. Pour cela, les isolats de sols et de racines sont introduits dans des bouteilles sérums de 1 litre directement après prélèvement. Les bouteilles sérums sont fermées par un bouchon en caoutchouc hermétique, permettant d'introduire et de prélever du gaz à l'intérieur à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. Cent ml de

$C_2H_2$  (10 %) sont ajoutés à l'aide d'une seringue dans le contenant de 1 litre et 100 ml sont retirés pour éviter la surpression. En fin d'expérimentation, 5 ml de gaz contenu dans la bouteille sont prélevés à l'aide d'une seringue et réinjectés dans un tube Vacutainer de 5 ml.

Chaque isolat de racine et 250 grammes de chaque isolat de sol est repartis dans 3 bouteilles selon 3 modalités. La première consiste à incuber les échantillons dans leur état naturel (ajout de 100 ml d'eau) et à prélever le gaz après 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 10 heures d'incubation au  $C_2H_2$ . La seconde modalité est une incubation des échantillons avec 100 ml d'une solution de glucose (1%) pour augmenter la quantité et l'activité des souches bactériennes présentes dans les échantillons, puis le gaz est prélevé comme précédemment. La dernière modalité consiste à incuber les échantillons pendant 36 heures à 27°C avec 100 ml une solution de glucose (1%) et ensuite à prélever le gaz comme précédemment. Afin de s'assurer de l'absence de problème technique, des témoins positifs sont mis en place ; ils sont constitués par des racines nodulées de *Sérianthes calycina* et de *Casuarina collina*. Les témoins négatifs sont des bouteilles vides, à l'intérieur desquelles on a injecté du  $C_2H_2$ . La formation de  $C_2H_4$  est mesurée par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe : Agilent 6850 Series GC Systems). L'avantage de l'utilisation du chromatographe en phase gazeuse réside dans sa sensibilité à de petites quantités de  $C_2H_4$  formé (nanomole de gaz / heure / gramme de racine) grâce à la détection par ionisation de flamme (Boddey et Döbereiner 1994).

#### **4.2.4. Dénombrement des populations microbiennes associées aux racines : flore totale et flore tolérante au nickel**

Pour quantifier les populations de bactéries mésophiles, aérobies et cultivables présentes sur chacun des 24 fragments de racines (préparés comme décrit au paragraphe 4.2.2.), ces échantillons sont pesés, broyés dans 200  $\mu$ l d'eau milli-Q stérile, puis centrifugés pour disloquer les colonies bactériennes et successivement dilués au  $10^e$ , au  $100^e$  et au  $1000^e$  afin de pouvoir en estimer le nombre. Cinquante  $\mu$ l de ces dilutions sont ensuite étalés en boîtes de Pétri sur le milieu de culture Yeast Mannitol Agar (YMA) (Vincent 1970) : mannitol (10g),  $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$  (0,66g), NaCl à 50mg/ml (1ml),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  à 10g/l (10 ml),  $FeCl_3$  à 4g/l (1ml),  $CaCl_2$  à 40 g/l (1ml), extrait de levure (1g),  $H_2O$  ultrapure qsp 1 litre, Agar (20g), pH 6,8. Ce



milieu de culture est utilisé pour la culture de certaines Protéobactéries (Fig 4.2) (Moulin et al. 2001) (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*) et permet également la culture d'un large spectre de microorganismes aérobies mésophiles. Les mesures et les isollements seront effectués uniquement sur les bactéries mésophiles aérobies. Deux modalités de sélection correspondant à 2 milieux de culture sont effectuées sur chaque broyat. Les 2 milieux de culture sont YMA et YMA enrichi avec 1 mM de nickel (YMA-Ni) sous forme  $\text{NiCl}_2$  autoclavés séparément.

Le nombre total de colonies bactériennes développées sur chaque boîte de Pétri est compté après 4 à 7 jours de culture à 28°C. La densité microbienne est estimée et exprimée en unité formant colonie (UFC) par gramme de racine (Cavaglieri et al. 2007). Pour des raisons pratiques, seules les dilutions contenant de 10 à 300 UFC sont utilisées pour le dénombrement des colonies. Une analyse statistique de comparaison de moyenne (test de Kruskal-Wallis) du nombre d'UFC par échantillon est effectuée en fonction des espèces et des sites de récoltes (Logiciel Xlstat 2008, Addinsoft) et ces données sont présentées sous forme d'un tableau.

#### **4.2.5. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des souches bactériennes isolées des racines de *Costularia***

##### **4.2.5.1. Caractérisation phénotypique des bactéries isolées**

Toutes les colonies bactériennes d'aspect différent de chaque échantillon ont été isolées à partir des deux modalités (YMA et YMA-Ni) et purifiées par culture individuelle sur boîte de Pétri. Dans un premier temps, une caractérisation simple des colonies à la loupe binoculaire (opacité, texture, couleur) et des cellules bactériennes au microscope optique (forme, mobilité) a permis de classer ces souches (Joffin et Leyral 2001). Les isolats choisis, suite à cette caractérisation, sont stockés à -80°C dans un milieu liquide YM ajusté à 20 % de glycerol (v/v). Différents tests de fonctionnalité destinés à détecter la capacité des souches à tolérer le nickel et à solubiliser les phosphates sont ensuite utilisés comme critère de sélection des bactéries.

#### **4.2.5.2. Tolérance des rhizobactéries aux fortes concentrations en nickel soluble**

La tolérance au nickel des bactéries rhizosphériques est évaluée par observation de leur capacité à croître sur des milieux de culture YMA enrichis à 1 mM, 3 mM et 15 mM de nickel (Chaintreuil et al. 2007). Le milieu de culture à 1 mM de nickel soluble correspond à une concentration en nickel DTPA représentative des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. L'utilisation d'un milieu de culture dont les teneurs en nickel sont très supérieures à celles présentes dans le milieu naturel permet une discrimination des souches les plus résistantes et permet d'estimer leur seuil de tolérance au nickel. Le nickel est ajouté au milieu de culture à partir d'une solution stock (1M de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) stérilisée séparément à l'autoclave (20mn, 120°C) et additionnée au milieu YMA (Pal et al. 2007). La capacité à croître sur les milieux YMA-Ni est estimée par notation de la présence ou de l'absence de croissance des colonies bactériennes après ensemencement.

#### **4.2.5.3. Capacité des rhizobactéries à solubiliser les phosphates inorganiques**

L'aptitude des bactéries isolées à solubiliser le tricalcium-orthophosphate (TCP), en rompant les liaisons phospho-calciques, est testée par culture des bactéries en boîte de Pétri sur un milieu de culture TCP contenant :  $\text{Ca}_3\text{-PO}_4$  (4g), glucose (10g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5g) ou  $\text{KNO}_3$  (10g),  $\text{NaCl}$  (1g),  $\text{MgSO}_4$  (1g) et de l'agar (20g) par litre à pH 7,2 (Frey-Klett et al. 2005). Cette action dissolvante peut être due à l'acidification du milieu ou à la production de molécules complexantes fortes comme les anions organiques citrates ou oxalates, qui semblent être les plus efficaces. Ces anions avec une forte affinité pour le calcium forment du citrate ou de l'oxalate de calcium libérant les phosphates du milieu TCP. Cette réaction dissoudra le milieu de culture le rendant translucide, montrant la capacité des souches testées à dissoudre les phosphates.

Cependant, si la culture est effectuée avec  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , l'acidification du milieu due à l'assimilation de  $\text{NH}_4$  peut être responsable de la dissolution du TCP. Au contraire, sur un milieu avec  $\text{NO}_3$ , il n'y aura plus d'acidification du milieu mais une alcalinisation éventuelle et le TCP ne sera dissous que si la bactérie produit des anions organiques, encore faut-il que les bactéries rhizosphériques soient capables d'assimiler le  $\text{NO}_3$ . C'est pourquoi par prudence, les cultures seront effectuées sur

les deux milieux de cultures TCP-NH<sub>4</sub> et TCP-NO<sub>3</sub>. Pour qu'une bactérie soit considérée comme solubilisatrice, elle doit être capable de former une auréole de dissolution sur les deux types de milieu TCP. Chacune des bactéries est distribuée par repiquage à la surface des deux milieux de culture. Après incubation à 28°C pendant 2 à 7 jours, autour des colonies bactériennes, les auréoles translucides dues à la dissolution du milieu, initialement opaque, indiquent une solubilisation du phosphate (Frey-Klett et al. 2005).

#### **4.2.6. Caractérisation moléculaire des souches isolées**

##### **4.2.6.1 Extraction de l'ADN génomique**

L'ADN génomique (ADNg) de chaque souche sélectionnée et cultivée pure en milieu YMA liquide est extrait à l'aide d'un kit d'extraction QIAgen (QIAamp® DNA Mini Kit) suivant les instructions du fabricant. Après extraction, les ADN sont stockés à -20°C dans le tampon d'extraction.

##### **4.2.6.2. Amplifications partielles des séquences d'ADNr 16S**

La séquence d'ADN codant pour l'ARN ribosomal de structure de la petite sous-unité 16S des ribosomes, dont la structure primaire est très conservée, est utilisée comme marqueur de détermination taxonomique et phylogénétique des micro-organismes. L'ADN total extrait est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans un volume réactionnel de 25 µl contenant : 2 µl d'ADN dilué au dixième, 8 µl d'eau ultra-pure, 5 µl de Tampon 5X, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl de dNTPs (désoxynucléotide triphosphate) dilué au quart, 0.125 µl de Taq Polymérase, 2 µl de primer Forward dilué au quarantième et 2 µl de primer Reverse dilué au quarantième. Les couples d'amorce utilisés pour l'amplification sont le couple 16S-1080r (5'-GGGACTTAACCCAACACTCT- 3')/16S-370f (5'-GGCAGCAGTGGGGAAT ATTG- 3') et le couple FGPS6 (5'-GGACAGTTAGATCT TGGCTACG-3')/FGPS1509 (5'-AAGGAGGGGATCCAGCCGCA-3'). Les tailles des fragments d'ADNr 16S attendues sont respectivement d'environ 700 et 1500 paires de bases (pb). Un témoin négatif, dans lequel l'ADN est remplacé par de l'eau pure, est utilisé pour vérifier l'absence de contamination d'ADN. Les PCR sont réalisées dans un thermocycleur Gene Amp PCR system 9700. Le programme utilisé est le suivant : un cycle de dénaturation initiale de l'ADN à 96°C pendant 3 min, puis 35 cycles

comprenant une dénaturation de l'ADN pendant 30 sec à 95°C, une hybridation de l'ADN à 58°C pendant 30 sec et une élongation de l'ADN à 72°C pendant 1 min.

#### **4.2.6.3. Recherche de *cnrA* et *nreB*, déterminants moléculaires de la tolérance au nickel**

Nos recherches ont ciblé l'étude de deux gènes de résistance au nickel, *nreB* et *cnrA* déjà isolés dans des bactéries rhizosphériques calédoniennes, dont les amorces ont déjà été utilisées (Chaintreuil et al. 2007 ; Stoppel et Schlegel 1995). La présence du gène *nreB* est contrôlée par amplification en utilisant les amorces *nreB*-425F (CCTTCACGCCGACTTTCCAG) et *nreB*-1179R (CGGATAGGTAATCAGCCAGCA). Ces amorces sont définies à partir de motifs conservés de la séquence *nreB* disponible dans les banques de données (GenBank). De la même manière, la présence du gène *cnrA* est recherchée par amplification en utilisant les amorces *cnrA*-F (ACAAGCAGGTSCAGATCAAC) et *cnrA*-R (TGATCAGGCCGAAGTCSAGCG). Ce couple d'amorce a également été défini à partir d'alignements multiples de différentes séquences de gène *cnrA* de *Ralstonia metallidurans* disponibles dans GenBank. L'ADN total extrait est amplifié par PCR dans un volume réactionnel de 25 µl contenant : 2 µl d'ADN dilué au dixième, 8 µl d'eau ultra-pure, 5 µl de Tampon 5X, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl de dNTPs (désoxynucléotide triphosphate) dilué au quart, 0.125 µl de Taq Polymérase, 2 µl de primer Forward et 2 µl de primer Reverse dilué au quarantième. Le programme du thermocycleur utilisé est le même que précédemment à la différence de la température d'hybridation des amorces qui est de 62°C pour *nreB* et 60°C pour *cnrA*.

#### **4.2.6.4 Migration sur gel d'agarose et purification des produits d'amplification**

Les produits d'amplification obtenus par PCR sont ensuite mis à migrer sur un gel d'agarose à 1% (w/v) afin de séparer les fragments d'ADN de différentes tailles. Le Bromure d'éthidium (agent intercalant des bases azotées) (0,5 µg/ml) est ajouté au gel d'électrophorèse afin de permettre la visualisation sous lampe UV des ADN amplifiés. La migration sur gel se fait dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE 0.5X, sous une tension de 120 volts pendant 45 min. Le marqueur de taille utilisé est le Smart Ladder 1Kb (Eurogentec), permettant de vérifier la taille du fragment amplifié ainsi que sa concentration. Les gels d'électrophorèse sont révélés

sous une lampe UV et photographiés. Les bandes d'ADN identifiées correspondant à la taille attendue sont découpées au scalpel et récupérées pour en extraire l'ADN. La purification des ADNr 16S amplifiées est réalisée à l'aide d'un kit d'extraction sur gel (QIAquick® Gel Extraction Kit, QIAGEN Courtaboeuf, France). Le dosage de l'ADN purifié est réalisé par spectrophotométrie (NanoDrop ND-1000), une quantité d'ADN minimale (10 ng/µl) est nécessaire pour permettre la réaction de séquençage.

#### 4.2.6.5 Analyse des séquences d'ADN obtenues

Le séquençage du produit de PCR purifié est réalisé par la société MacroGen (Séoul, Corée). Pour le séquençage total, six amorces ont été définies dans les deux sens de manière à pouvoir recouvrir tout l'ADN. À la réception des électrophorégrammes, les séquences 16S sont corrigées et les informations sont traitées à l'aide du logiciel Chromas pro. Les séquences issues de Forward et de Reverse sont assemblées afin d'obtenir une séquence consensus. Copiée sous format Fasta, cette séquence permet d'effectuer une recherche par Blast-N (Logiciel NCBI Blast), par interrogation des données en ligne de la banque de gènes : GenBank. L'existence de banques d'ADNr 16S très importantes et du logiciel d'alignement Blast permet de situer la séquence d'ADN ribosomal inconnue par rapport aux séquences des souches connues provenant de la base de données Genbank. Quatre paramètres d'homologie (total score, query coverage, E value, max ID) permettent d'estimer et de valider la robustesse des résultats.

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Caractérisation des sols rhizosphériques

Les sols possèdent des caractéristiques différentes suivant les sites. L'horizon de surface du site 1 (Koniambo) correspond à un sol ferritique colluvionné, celui du site 2 (Koniambo) à un sol ferritique gravillonnaire, celui du site 3 (Mont-Dore) également à un sol ferritique colluvionné et enfin le site 4 (Plum) est caractérisé par un sol de type saprolitique plus riche en Ca et Mg (Tableau 4.1). Il est intéressant de noter que le contenu en nickel total, exceptionnellement haut, des échantillons de sol, est compris entre 4360 et 7540 mg kg<sup>-1</sup> de sol. La fraction potentiellement échangeable de nickel (extrait DTPA) est comprise entre 53 et 261 mg kg<sup>-1</sup> de sol ; cette dernière concentration peut être considérée comme très élevée.

**Tableau 4.1.** Caractéristiques chimiques des sols rhizosphériques de *Costularia* des quatre différents sites

Site		site 1	site 2	site 3	site 4
Localisation		Koniambo	Koniambo	Mont Dore	Plum
Type de sol		Ferritique colluvionné	Ferritique gravillonnaire	Ferritique colluvionné	Saprolitique
Coordonnées GPS	Sud	22°02'269"	22°00'387"	22°15'556"	22°16'295"
	Est	164°50'327"	164°48'378"	166°35'451"	166°38'848"
Valeur de pH		5,7	4,9	5,4	6,3
Concentration total en éléments					
	N g kg <sup>-1</sup>	1,725	0,99	1,16	1,64
	P mg kg <sup>-1</sup>	162	119	105	64
	K mg kg <sup>-1</sup>	77	20,79	ND	139,73
	Ca mg kg <sup>-1</sup>	790	630	570	4860
	Mg mg kg <sup>-1</sup>	10642	7273	12685	36495
	Fe g kg <sup>-1</sup>	348	397	340	240
	Ni mg kg <sup>-1</sup>	5644	4360	7540	6705
	Co mg kg <sup>-1</sup>	1394	667	949	672
Concentration en métal extractible Extrait DTPA					
	Mg mg kg <sup>-1</sup>	108	195	162	927
	Ni mg kg <sup>-1</sup>	53	96	76	261
	Fe mg kg <sup>-1</sup>	112	80	95	127
	Co mg kg <sup>-1</sup>	49	61	57	69

#### 4.3.2. Détection de l'activité réductrice d'acétylène dans les rhizosphères de *Costularia*

Les mesures effectuées sur les témoins négatifs ont une quantité résiduelle de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (aire pic C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (S) résiduelle moyenne = 32 unités) dans les flacons. Les témoins positifs constitués de racines nodulées de *Serianthes calycina* (S = 363 unités = 2961 nmol/h) et *Casuarina collina* (S = 483 unités = 4027 nmol/h) ont une activité enzymatique croissante par rapport au temps d'incubation (Tableau 4.2). Pour l'ensemble des 3 modalités d'incubation, la majorité des échantillons de racines de *Costularia sp.* et de sols rhizosphériques ne montrent pas d'augmentation de la quantité d'éthylène dans le temps (valeurs de S comprises entre 29,5 et 35,4 unités, équivalent à des valeurs d'ARA comprises entre 0 et 30,4 nmol/h/échantillons) et cette quantité est similaire à la quantité d'éthylène résiduel des témoins négatifs. Quelques résultats (plants n° 16-18-21-24) indiquent une faible augmentation de la quantité d'éthylène dans le temps de 90 à 130 nmol/h/échantillons, ce qui n'est pas négligeable pour des bactéries libres fixatrices d'azote. Les résultats obtenus sur les témoins positifs et négatifs indiquent un bon déroulement des expérimentations,

cependant, ils ne permettent pas de mettre en évidence une activité nitrogénase significative sur les échantillons testés.

**Tableau 4.2.** Mesures des activités réductrices d'acétylène des échantillons de rhizosphère de *C. arundinaceae* et *C. nervosa* des sites 3 et 4, par chromatographie en phase gazeuse

Sites	Espèces	Echantillons	n° plant	Aire du pic C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	ARA $\mu$ mol /h/échantillons
3	<i>C. arundinaceae</i>	Sol	20	35,4	30,4
		Racine	20	33,5	13,03
	<i>C. arundinaceae</i>	Sol	22	29,5	-22,2
		Racine	22	33,9	17,6
	<i>C. arundinaceae</i>	Sol	24	45,5	<b>120,9</b>
		Racine	24	32,3	8,9
	<i>C. nervosa</i>	Sol	14	35,2	28,6
		Racine	14	34,8	24,6
	<i>C. nervosa</i>	Sol	16	42,3	<b>91,5</b>
		Racine	16	30,3	-15,6
	<i>C. nervosa</i>	Sol	18	46,2	<b>127,5</b>
		Racine	18	33,2	11,1
	<i>C. arundinaceae</i>	Sol	19	34,8	24,6
		Racine	19	2,7	-20,9
	<i>C. arundinaceae</i>	Sol	21	30,7	-11,4
		Racine	21	42,6	<b>94,2</b>
4	<i>C. arundinaceae</i>	Sol	23	33,1	9,4
		Racine	23	32,2	2,3
	<i>C. nervosa</i>	Sol	15	30,2	-15,9
		Racine	15	31,9	-4,8
	<i>C. nervosa</i>	Sol	17	29,6	-21,2
		Racine	17	31,5	-12,3
	<i>C. nervosa</i>	Sol	13	35,1	26,3
		Racine	13	32,1	1,23
	<i>Casuarina collina</i>	Témoin positif		535	4490
	<i>Casuarina collina</i>	Témoin positif		431	3564
	<i>Serianthes calycina</i>	Témoin positif		407	3347
	<i>Serianthes calycina</i>	Témoin positif		321	2577

#### 4.3.3. Dénombrement des populations associées aux racines de *Costularia*

Sur l'ensemble des échantillons, la densité moyenne des bactéries cultivables sur milieu YMA est comprise entre  $3,19 \times 10^4$  ( $\pm 1,8$ ) et  $18,39 \times 10^4$  ( $\pm 4,4$ ) UFC par gramme de matière fraîche de racines avec une valeur moyenne de  $8,7 \times 10^4$  ( $\pm 5,3$ ) UFC (Tableau 4.3). Pour les mêmes échantillons cultivés sur milieu YMA enrichi à 1mM de nickel, la densité moyenne des bactéries cultivables varie de  $1,75 \times 10^4$  ( $\pm 1,2$ ) à  $9,14 \times 10^4$  ( $\pm 1,2$ ) UFC par gramme de matière fraîche de racines avec une valeur moyenne de  $3,7 \times 10^4$  ( $\pm 2,6$ ) UFC. Le rapport des densités bactériennes

rhizosphériques résistantes à 1mM de nickel soluble sur les densités bactériennes rhizosphériques totales (Rr/Rtot) pour chacune des 8 modalités d'échantillonnages (sites, espèces) varie de 37 à 55% avec une valeur moyenne de 43% ( $\pm 8$ ).

**Tableau 4.3.** Densité totale et résistante à 1 mM de Ni des populations bactériennes au contact des racines de *C. arundinacea* et *C. nervosa*

Sites	Espèces	Rhizosphère total (10 <sup>4</sup> CFU g <sup>-1</sup> de racine)	Rhizosphère tolérante 1mM Ni (10 <sup>4</sup> CFU g <sup>-1</sup> de racine)	Rapport densité tolérante / totale (%)
1	<i>C. arundinacea</i>	5,67 $\pm$ 2,8	2,20 $\pm$ 0,8	39
	<i>C. nervosa</i>	4,11 $\pm$ 2,3	1,83 $\pm$ 1,2	45
2	<i>C. arundinacea</i>	3,19 $\pm$ 1,8	1,75 $\pm$ 1,2	55
	<i>C. nervosa</i>	6,17 $\pm$ 2,6	2,38 $\pm$ 1,5	39
3	<i>C. arundinacea</i>	12,85 $\pm$ 4,3	3,86 $\pm$ 0,9	30
	<i>C. nervosa</i>	12,88 $\pm$ 4,2	5,81 $\pm$ 3,6	45
4	<i>C. arundinacea</i>	18,39 $\pm$ 4,4	9,14 $\pm$ 1,2	50
	<i>C. nervosa</i>	6,05 $\pm$ 0,7	2,23 $\pm$ 0,5	37

Les analyses statistiques de comparaison de variance et de moyenne (test t, test de Fisher et test de Kruskal-Wallis) confirment la différence significative ( $P < 0,001$ ) entre les deux populations issues des milieux de culture YMA et YMA-Ni (Tableau 4.3). Les mêmes tests appliqués sur les populations totales des deux espèces de *Costularia* ne mettent pas en évidence de différence significative entre les densités rhizosphériques des deux espèces. En ce qui concerne la densité de bactérie au sein des 4 sites, les tests statistiques de comparaison de moyennes indiquent que seul le site 3 ( $12,8 \times 10^4$  UFC) semble se distinguer par des valeurs significativement supérieures ( $P < 0,01$ ) à celle des sites 1 et 2 (environ  $5 \times 10^4$  UFC). Les sites 1 et 2 sont les deux sites du massif du Koniambo, ils semblent similaires en termes de densité de bactéries cultivables indépendamment des deux espèces et des deux sites testés, et ne diffèrent pas non plus du site 4 qui correspond au site de Plum.

#### 4.3.4. Diversité phénotypique des bactéries de la rhizosphère

Une biodiversité phénotypique importante a été observée après culture sur boîte des broyats racinaires des deux espèces de *Costularia*. Un total de 217 colonies bactériennes a pu être isolé de l'ensemble des boîtes de Pétri contenant les cultures. Ces colonies, opaques ou translucides, sont généralement de consistance crémeuse ou muqueuse et de couleurs variées (gamme de jaune et de blanc, rose, orange ou translucide) (Tableau 4.4). Les observations microscopiques des bactéries révèlent



une grande majorité de bacilles de forme et de taille diverses et de mobilité variée (30% immobile, 20% péritriche et 50% polaire). Quelques bactéries de morphologie coque et coccobacille ont été isolées ainsi que des levures et des actinomycètes. Les 217 colonies isolées sont regroupées en une collection de 112 bactéries, réalisée en fonction des caractères phénotypiques et fonctionnels des isolats (28 souches à phénotype particulier et 84 souches tolérantes à 1mM de nickel) (Tableau 4.4).

#### **4.3.5. Diversité fonctionnelle des bactéries de la rhizosphère**

##### **4.3.5.1. Caractérisation de la tolérance au nickel soluble des rhizobactéries**

La tolérance au nickel des bactéries provenant des 24 échantillons de racines de *Costularia* est testée sur les 84 isolats résistants à 1 mM (Tableau 4.4). Les isolats bactériens tolérants 1 mM de nickel représentent 38% de la population totale isolée au départ, ceux tolérant 3mM représentent 33% (72 isolats) et ceux 15 mM, 14% des isolats de départ (30 souches). La caractérisation indique que le nombre de souches bactériennes isolées résistantes au nickel décroît avec l'augmentation de la concentration de nickel soluble dans le milieu de culture (Tableau 4.4). Au sein des sites 1, 3 et 4, ces souches résistantes à 15 mM de nickel soluble sont observées dans la rhizosphère des deux espèces, alors que dans le site 2, elles sont observées uniquement au contact des racines de *C. arundinacea*.

##### **4.3.5.2. Capacité des rhizobactéries à solubiliser les phosphates**

À l'issue des tests de tolérance au nickel et des caractérisations phénotypiques, 112 souches ont été sélectionnées pour leur capacité à croître avec de fortes teneurs en nickel soluble correspondant aux teneurs des sols miniers à revégétaliser. Les 112 souches bactériennes choisies, inoculées individuellement, ont poussé sur les milieux TCP agar  $\text{NH}_4$  et TCP agar  $\text{NO}_3$ . Vingt et une souches forment un halo de dégradation (zone claire autour de la colonie bactérienne) sur les deux milieux TCP ( $\text{NH}_4$  et  $\text{NO}_3$ ) indiquant la dégradation du calcium-phosphate du milieu de culture et la libération des phosphates. Ces souches solubilisatrices sont identifiées au sein des deux espèces *C. comosa* et *C. arundinacea* et ceci dans les quatre sites de prélèvement (Tableau 4.4).

**Tableau 4.4.** Caractérisation phénotypique des bactéries isolées à partir des racines des deux espèces de *Costularia*, caractérisation fonctionnelle de la tolérance au nickel et de la capacité à solubiliser les phosphates, des souches sélectionnées

Site	Espèces	n° plant	réf. souche	Phénotype des colonies			Phénotype des bactéries		Résistance au nickel			TCP dissous	signal d'amplification de déterminant de résistance au nickel	réf. souche
				Opacité	Consistance	Couleur	Morphologie	Mobilité	1 mM	3 mM	15 mM			
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	2	AD	opaque	crémeux	bien blanc	bacille	polaire	+	+	+	0	-	AD
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	2	AE	opaque	crémeux	blanc	bacille	polaire	+	+	+	0	NreB	AE
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	6	B	opaque	muqueux	bien blanc	bacille	polaire	+	+	-	0	-	B
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	6	C	opaque	crémeux	bien blanc	bacille	péritriche	+	+	+	0	-	C
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	6	D	translucide	crémeux	bien blanc	bacille	péritriche	+	+	-	0	-	D
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	4	DA	translucide	muqueux	rose claire	bacille	polaire	+	+	-	0	-	DA
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	6	DB	translucide	muqueux	incolore	bacille	péritriche	+	+	+	0	Nreb / CnrA	DB
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	4	DJ	translucide	crémeux	rose claire	bacille	péritriche	+	+	-	0	Nreb / CnrA	DJ
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	4	DL	opaque	crémeux	blanc cassé	bacille	-	+	+	-	0	-	DL
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	2	DZ	?	crémeux	?	petit bacille	polaire	+	-	-	0	NreB	DZ
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	2	E	translucide	muqueux	incolore	bacille	?	+	+	+	0	NreB	E
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	2	EE	?	?	?	?	?	+	-	-	0	-	EE
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	6	EL	opaque	muqueux	jaune	bacille	polaire	-	-	-	0	-	EL
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	4	EN	opaque	?	moutarde	bacille	péritriche	+	+	-	0	NreB	EN
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	4	GS	translucide	muqueux	jaunâtre	bacille	péritriche	-	-	-	+	-	GS
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	6	GX	opaque	crémeux	incolore	bacille	péritriche	-	-	-	+	-	GX
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	6	HG	mi opaque	crémeux	blanc	long bacille	polaire	+	+	-	0	NreB	HG
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	2	HH	opaque	crémeux	blanc cassé	bacille	polaire	+	+	+	0	Nreb / CnrA	HH
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	2	IU	opaque	crémeux	blanc cassé	?	?	+	+	-	0	-	IU
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	2	J	translucide	crémeux	blanc cassé	petit bacille	péritriche	-	-	-	+	-	J
Site 1	<i>C. arundinacea</i>	4	L	opaque	crémeux	incolore	petit bacille	péritriche	+	+	-	0	CnrA	L
Site 1	<i>C. nervosa</i>	3	AC	opaque	crémeux	incolore	bacille	péritriche	+	+	+	+	Nreb / CnrA	AC
Site 1	<i>C. nervosa</i>	3	CT	translucide	crémeux	blanc	bacille	polaire	+	+	+	+	-	CT
Site 1	<i>C. nervosa</i>	3	CW	mi opaque	crémeux	incolore	bacille	péritriche	-	-	-	+	-	CW
Site 1	<i>C. nervosa</i>	5	CX	translucide	crémeux	incolore	bacille	péritriche	-	-	-	+	-	CX
Site 1	<i>C. nervosa</i>	1	EK	opaque	crémeux	orange	bacille	polaire	-	-	-	0	-	EK
Site 1	<i>C. nervosa</i>	1	EM	mi opaque	crémeux	jaunâtre	bacille	polaire	+	+	+	+	-	EM
Site 1	<i>C. nervosa</i>	5	EO	opaque	muqueux	moutarde	bacille	péritriche	-	-	-	0	-	EO
Site 1	<i>C. nervosa</i>	1	GY	mi opaque	crémeux	incolore	bacille	péritriche	+	+	-	0	NreB	GY
Site 1	<i>C. nervosa</i>	5	M	mi opaque	crémeux	blanc	bacille	polaire	+	+	-	0	-	M
Site 1	<i>C. nervosa</i>	5	N	opaque	crémeux	incolore	bacille	polaire	+	?	?	?	Nreb / CnrA	N

Site	Espèces	n° plant	réf. souche	Phénotype des colonies			Phénotype des bactéries		Résistance au nickel			TCP dissous	signal d'amplification de déterminant de résistance au nickel	réf. souche
				Opacité	Consistance	Couleur	Morphologie	Mobilité	1 mM	3 mM	15 mM			
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	8	AB	opaque	crémeux	incolore	bacille	péritrche	+	+	+	0	-	AB
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	10	AF	opaque	crémeux	incolore	bacille	polaire	+	+	+	0	NreB	AF
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	8	CU	translucide	crémeux	blanc	bacille	-	-	-	-	+	-	CU
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	12	DE	translucide	crémeux	rosée	bacille	polaire	+	+	-	0	CnrA	DE
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	12	DO	mi opaque	crémeux	rose orangé	coque	?	-	-	-	0	-	DO
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	8	G	opaque	crémeux	incolore	bacille	-	+	+	+	0	NreB	G
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	10	HE	mi opaque	crémeux	jaune fluo	bacille	?	+	+	+	+	-	HE
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	8	HK	opaque	crémeux	blanc cassé	bacille	polaire	+	+	+	0	NreB	HK
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	12	IJ	translucide	crémeux	incolore	bacille	péritrche	+	+	-	+	Nreb / CnrA	IJ
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	10	IT	translucide	crémeux	incolore	bacille	?	+	-	-	0	NreB	IT
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	10	R	translucide	crémeux	incolore	bacille	?	+	-	-	?	-	R
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	12	X	translucide	crémeux	blanc cassé	coque	polaire	+	+	-	0	Nreb / CnrA	X
Site 2	<i>C. arundinacea</i>	10	Z	mi opaque	crémeux	incolore	bacille	polaire	+	+	-	0	-	Z
Site 2	<i>C. nervosa</i>	11	AG	opaque	muqueux	incolore	bacille	péritrche	+	+	-	0	Nreb / CnrA	AG
Site 2	<i>C. nervosa</i>	7	CV	translucide	crémeux	incolore	bacille	polaire	-	-	-	+	-	CV
Site 2	<i>C. nervosa</i>	9	CY	translucide	crémeux	incolore	bacille	polaire	+	+	-	+	-	CY
Site 2	<i>C. nervosa</i>	9	CZ	mi opaque	crémeux	blanc	bacille	polaire	-	-	-	0	-	CZ
Site 2	<i>C. nervosa</i>	11	DF	translucide	crémeux	rosée	bacille	polaire	+	+	-	0	NreB	DF
Site 2	<i>C. nervosa</i>	7	DP	translucide	crémeux	rose claire	bacille	polaire	+	+	-	0	-	DP
Site 2	<i>C. nervosa</i>	11	FC	opaque	crémeux	moutarde	bacille	polaire	-	-	-	0	-	FC
Site 2	<i>C. nervosa</i>	7	FD	mi opaque	muqueux	moutarde	bacille	-	-	-	-	0	-	FD
Site 2	<i>C. nervosa</i>	9	IK	translucide	crémeux	incolore	bacille	péritrche	-	-	-	+	-	IK
Site 2	<i>C. nervosa</i>	11	P	mi opaque	crémeux	incolore	bacille épingle	polaire	+	+	-	0	NreB	P
Site 2	<i>C. nervosa</i>	11	S	opaque	crémeux	incolore	bacille	péritrche	+	+	-	0	CnrA	S
Site 2	<i>C. nervosa</i>	7	T	opaque	crémeux	incolore	petit bacille	polaire	+	-	-	0	-	T
Site 2	<i>C. nervosa</i>	11	U	mi opaque	crémeux	blanc	petit bacille	polaire	+	+	-	0	-	U
Site 2	<i>C. nervosa</i>	9	Y	opaque	crémeux	jaunâtre	bacille	?	+	+	-	0	Nreb / CnrA	Y

Site	Espèces	n° plant	réf. souche	Phénotype des colonies			Phénotype des bactéries		Résistance au nickel			TCP dissous	signal d'amplification de déterminant de résistance au nickel	réf. souche
				Opacité	Consistance	Couleur	Morphologie	Mobilité	1 mM	3 mM	15 mM			
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	16	BO	mi translucide	muqueux	blanc cassé	bacille	-	+	+	-	0	Nreb / CnrA	BO
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	18	BP	translucide	crémeux	blanc	bacille	-	-	-	-	+	-	BP
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	16	BQ	translucide	crémeux	incolore	bacille	polaire	+	+	+	0	-	BQ
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	14	BU	transparent	crémeux	incolore	bacille épingle	-	+	+	-	0	-	BU
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	14	DQ	mi opaque	crémeux	rose claire	bacille	polaire	+	+	-	0	-	DQ
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	18	FE	opaque	muqueux	rose orangé	bacille épingle	-	-	-	-	0	-	FE
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	18	FF	opaque	crémeux-sec	rose rouge	long bacille	-	-	-	-	0	-	FF
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	18	FN	?	?	?	?	?	+	+	+	0	-	FN
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	14	FR	translucide	crémeux	orange fluo	bacille	polaire	+	+	-	0	-	FR
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	16	GF	mi opaque	crémeux	incolore	bacille	péritriche	+	+	-	0	Nreb / CnrA	GF
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	16	GH	transparent	crémeux	incolore	bacille	-	+	-	-	0	-	GH
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	14	HW	mi opaque	muqueux	bien blanc	bacille	polaire	+	+	+	0	-	HW
Site 3	<i>C. arundinacea</i>	18	ID	opaque	mi crémeux	bien blanc	bacille	-	+	+	+	0	NreB	ID
Site 3	<i>C. nervosa</i>	15	BR	mi opaque	muqueux	blanc cassé	grand bacille	polaire	+	-	-	0	CnrA	BR
Site 3	<i>C. nervosa</i>	15	BS	translucide	?	incolore	bacille	polaire	+	-	-	0	-	BS
Site 3	<i>C. nervosa</i>	19	BT	mi opaque	mi muqueux	incolore	bacille	polaire	+	+	+	0	NreB	BT
Site 3	<i>C. nervosa</i>	19	CA	opaque	crémeux	blanc	grand bacille	-	+	+	+	0	NreB	CA
Site 3	<i>C. nervosa</i>	17	FG	translucide	crémeux	orange	long bacille épingle	-	-	-	-	0	-	FG
Site 3	<i>C. nervosa</i>	17	FI	opaque	muqueux	jaune orangé	bacille	-	-	-	-	0	-	FI
Site 3	<i>C. nervosa</i>	15	FM	mi opaque	sec	jaune	bacille	polaire	-	-	-	?	-	FM
Site 3	<i>C. nervosa</i>	15	GE	translucide	crémeux	incolore	bacille	péritriche	+	+	+	0	-	GE
Site 3	<i>C. nervosa</i>	17	GJ	opaque	crémeux	orangée	bacille	-	-	-	-	0	-	GJ
Site 3	<i>C. nervosa</i>	17	GL	mi opaque	muqueux	blanc cassé	bacille	polaire	+	-	-	0	-	GL
Site 3	<i>C. nervosa</i>	19	HX	opaque	muqueux	bien blanc	bacille	polaire	+	+	+	+	NreB	HX
Site 3	<i>C. nervosa</i>	15	IF	opaque	crémeux	blanc	bacille	-	+	+	+	0	NreB	IF

Site	Espèces	n° plant	réf. souche	Phénotype des colonies			Phénotype des bactéries		Résistance au nickel			TCP dissous	signal d'amplification de déterminant de résistance au nickel	réf. souche
				Opacité	Consistance	Couleur	Morphologie	Mobilité	1 mM	3 mM	15 mM			
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	22	AH	opaque	muqueux	blanc cassé	bacille épingle	-	+	+	-	0	Nreb / CnrA	AH
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	22	AL	translucide	crèmeux	blanc	bacille	-	+	+	+	0	NreB	AL
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	22	AM	opaque	crèmeux	blanc	bacille	polaire	+	-	-	0	-	AM
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	20	AN	opaque	muqueux	incolore	bacille épingle	-	+	+	+	0	Nreb / CnrA	AN
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	20	AW	translucide	muqueux	incolore	bacille épingle	-	+	+	-	0	-	AW
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	20	AX	opaque	muqueux	incolore	long bacille épingle	-	+	+	-	0	-	AX
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	24	BB	translucide	crèmeux	incolore	long bacille épingle	-	+	-	-	0	CnrA	BB
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	20	ES	opaque	muqueux	jaune claire	bacille	polaire	+	+	-	+	-	ES
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	24	EV	translucide	mi muqueux	orange	bacille	péritriche	-	-	-	0	-	EV
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	22	FW	opaque	crèmeux	rose orangé	bacille	péritriche	-	-	-	0	-	FW
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	22	FZ	translucide	crèmeux	blanc	petit bacille	-	-	-	-	+	-	FZ
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	22	GC	translucide	crèmeux	jaune	bacille	-	-	-	-	0	-	GC
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	24	II	mi opaque	mi crèmeux	blanc cassé	bacille épingle	polaire	+	+	-	0	-	II
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	24	IM	translucide	crèmeux	jaune orangé	bacille	-	-	-	-	+	-	IM
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	24	IN	?	?	?	?	?	+	+	-	0	-	IN
Site 4	<i>C. arundinacea</i>	20	IR	opaque	muqueux	blanc cassé	bacille épingle	polaire	+	+	-	0	NreB	IR
Site 4	<i>C. nervosa</i>	3	AK	translucide	muqueux	incolore	long bacille épingle	-	+	-	-	0	NreB	AK
Site 4	<i>C. nervosa</i>	19	AP	mi opaque	mi muqueux	blanc cassé	bacille	polaire	+	+	-	0	Nreb / CnrA	AP
Site 4	<i>C. nervosa</i>	21	AQ	opaque	crèmeux	incolore	bacille	-	+	+	-	0	NreB	AQ
Site 4	<i>C. nervosa</i>	19	AS	translucide	crèmeux	incolore	bacille	-	+	+	+	0	NreB	AS
Site 4	<i>C. nervosa</i>	21	AT	opaque	crèmeux	incolore	long bacille épingle	-	+	+	-	0	Nreb / CnrA	AT
Site 4	<i>C. nervosa</i>	23	BCc	translucide	crèmeux	incolore	bacille	-	+	+	+	+	NreB	BCc
Site 4	<i>C. nervosa</i>	19	ET	translucide	muqueux	jaune moutarde	bacille	polaire	-	-	-	0	-	ET
Site 4	<i>C. nervosa</i>	19	HR	translucide	muqueux	blanc cassé	bacille	-	+	+	+	0	CnrA	HR
Site 4	<i>C. nervosa</i>	23	IC	opaque	mi muqueux	blanc	bacille	péritriche	+	+	+	0	CnrA	IC
Site 4	<i>C. nervosa</i>	23	IL	opaque	muqueux	blanc cassé	bacille épingle	-	+	+	-	+	-	IL
Site 4	<i>C. nervosa</i>	21	IQ	translucide	crèmeux	incolore	bacille épingle	polaire	+	+	-	0	Nreb / CnrA	IQ
Site 4	<i>C. nervosa</i>	23	IS	translucide	mi muqueux	blanc cassé	bacille épingle	-	+	+	+	0	Nreb / CnrA	IS
Site 4	<i>C. nervosa</i>	21	IV	?	?	?	?	?	+	+	-	0	NreB	IV

? : données manquantes

- : pas de signal positif de mobilité de la bactérie, de croissance sur boîte de Pétri ou d'amplification par PCR décelé

+ : signal positif de croissance sur boîte de Pétri ou d'amplification par PCR

0 : aucun halo de dissolution du milieu de culture TCP observé

### 4.3.6. Diversité génétique des bactéries sélectionnées

#### 4.3.6.1. Caractérisation des souches isolées à l'aide des données moléculaires de l'ADNr 16S

Une importante diversité génétique a été isolée au contact des racines de *Costularia*. Parmi la collection de 112 souches bactériennes, 92 souches appartenant à 14 genres, ont pu être caractérisées à l'aide des données moléculaires de l'ADNr 16S (données complètes : Tableau 4.5 et 4.6). Quarante sept souches, réparties en 11 genres, proviennent de la rhizosphère de *C. arundinacea* et 40 souches, réparties en 14 genres, de celle de *C. nervosa* (Tableau 4.7). Les résultats indiquent que les genres les plus fréquents sont représentés par *Bradyrhizobium* (31,1%), *Burkholderia* (22,8%), *Curtobacterium* (11,8%), *Pseudomonas* (5,9%) et *Sphingomonas* (5,6%) (Tableau 4.7). La distribution des deux genres dominants, *Bradyrhizobium* et *Burkholderia* ne montre pas de différence significative (test de Kruskal-Wallis) entre les deux espèces et les quatre sites échantillonnés (données synthétiques : Fig 4.2). De même la distribution du genre *Curtobacterium* est homogène entre les deux espèces, mais ce genre n'est pas identifié au sein du site 4 de Plum.

#### 4.3.6.2. Caractérisation moléculaire des souches tolérantes au nickel

Parmi les 92 isolats caractérisés, 69 souches appartenant à 11 genres sont résistantes à 1 mM de nickel (*Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Methylobacterium*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Pantoea* et *Azorhizobium*). Soixante de ces souches résistent également à 3 mM de nickel, elles sont représentées par les mêmes genres que précédemment. Enfin, 25 souches résistent également à 15 mM. Ces dernières sont représentées par les genres *Burkholderia* (14 souches), *Bradyrhizobium* (4 souches), *Curtobacterium* (3 souches), et *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Pantoea* (1 souche).

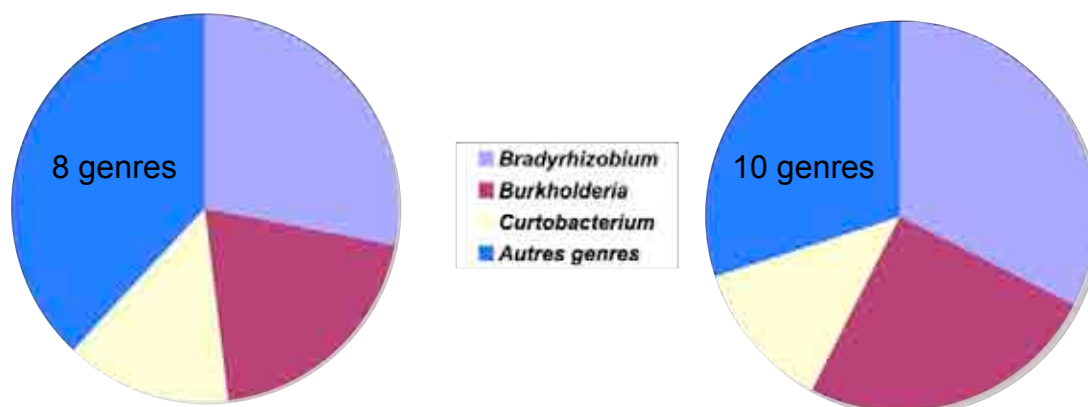
**Tableau 4.5.** Résultats par Blast-N des analyses de séquences partielles de la petite SU 16S de l'ADNr de *Costularia arundinacea*

Site	Réf. souche	Partial 16S (pb)	Analyse blast partial 16S (650pb)						
			Genre	Espèce	Accession number	Total score	Query coverage	E value	max ID
Site 4	FZ	667	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	FJ263920.1	1175	99%	0.0	99%
Site 4	FW	635	<i>Aurantimonas</i>	<i>A. altamirensis</i>	EU697964.1	1007	100%	0.0	95%
Site 4	AH	630	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	BA000040.2	325	59%	1,00E-85	70%
Site 2	IT	656	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	FJ784890.1	1095	99%	3,00E-156	98%
Site 2	X	1391	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	FJ436370.1	2489	100%	0.0	99%
Site 4	BB	1418	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	AY904765.1	2488	99%	0.0	99%
Site 3	BO	714	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	FJ025099.1	1256	99%	0.0	99%
Site 4	IN	624	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. liaoningense</i>	FJ418695.1	1108	100%	0.0	99%
Site 4	AM	666	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ418929.1	1180	100%	0.0	99%
Site 4	AW	198	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ687965.1	338	100%	5,00E-90	98%
Site 4	AX	272	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ193314.1	473	97%	2,00E-130	99%
Site 1	DA	788	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ418929.1	1202	86%	0.0	98%
Site 3	GF	652	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ687962.1	1122	96%	0.0	99%
Site 2	HE	629	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	EU364706.1	1104	99%	0.0	99%
Site 4	IR	622	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ687962.1	1108	100%	0.0	99%
Site 2	IJ	643	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	AY528712.1	1117	99%	0.0	99%
Site 1	AD	857	<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i>	AY741358.1	1204	96%	0.0	98%
Site 1	HH	250	<i>Burkholderia</i>	<i>B. phymatum</i>	CP001044.1	419	100%	3,00E-114	97%
Site 2	AB	676	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ434110.1	1196	100%	0.0	99%
Site 1	AE	475	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ025138.1	767	98%	0.0	97%
Site 2	AF	676	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	AY178062.1	1076	96%	0.0	97%
Site 2	G	681	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	EU477797.1	1110	98%	0.0	97%
Site 1	HG	695	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	EF149008.1	1076	91%	0.0	97%
Site 2	HK	674	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ434110.1	1157	99%	0.0	98%
Site 3	ID	728	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	EF149008.1	1097	98%	0.0	94%
Site 1	D	865	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	AF247494.1	1204	80%	0.0	97%
Site 1	E	1413	<i>Curtobacterium</i>	<i>C. citreum</i>	AM410690.1	2488	100%	0.0	99%
Site 1	B	779	<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	EU741027.1	1227	87%	0.0	99%
Site 3	BQ	818	<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	EU741027.1	1234	84%	0.0	99%
Site 3	DQ	663	<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	EU741027.1	1186	99%	0.0	99%
Site 4	ES	644	<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	EU741027.1	1150	99%	0.0	99%
Site 3	FN	810	<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	EU741027.1	1198	82%	0.0	99%
Site 1	L	756	<i>Curtobacterium</i>	<i>C. albidum</i>	AM410691.1	1364	100%	0.0	100%
Site 1	DJ	653	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. komagatae</i>	FJ786402.1	1074	95%	0.0	98%
Site 1	DL	500	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. variable</i>	AB302931.1	832	100%	0.0	96%
Site 2	DE	648	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium</i> sp.	FJ006916.1	1095	97%	0.0	98%
Site 1	DZ	648	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>	FJ816022.1	1144	100%	0.0	99%
Site 1	EE	621	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>	EU379294.1	1047	99%	0.0	98%
Site 1	EL	674	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i> sp.	EU780667.1	1160	99%	0.0	98%
Site 1	GS	654	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i> sp.	FJ611863.1	1121	99%	0.0	98%
Site3	HW	617	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i> sp.	FJ611863.1	1040	100%	0.0	97%
Site 2	CU	714	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ719357.1	1272	99%	0.0	99%
Site 1	DB	663	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ786068.1	1189	99%	0.0	99%
Site 1	J	385	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	EU781733.1	634	97%	1,00E-178	98%
Site 4	EV	647	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. mali</i>	FJ772027.1	1135	99%	0.0	99%
Site 1	EN	1396	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. yunnanensis</i>	AY894691.1	2443	99%	0.0	99%
Site 3	FR	629	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. yunnanensis</i>	EU730917.1	1124	99%	0.0	99%
Site 4	AL	656	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i> sp.	EU723093.1	1067	99%	0.0	96%
Site 3	FE	798	<i>Williamsia</i>	<i>W. serinedens</i>	AM283464.1	1184	83%	0.0	99%
Site 3	FF	400	<i>Williamsia</i>	<i>W. serinedens</i>	AM283464.1	719	99%	0.0	100%

**Tableau 4.6.** Résultats par Blast-N des analyses de séquences partielles de la petite SU 16S de l'ADNr de *Costularia nervosa*

Site	Réf. souche	Partial 16S (pb)	Analyse blast partial 16S (650pb)						
			Genre	Espèce	Accession number	Total score	Query coverage	E value	max ID
Site 4	IQ	592	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	EU921459.1	904	100%	0.0	94%
Site 1	CW	694	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	FJ560466.1	1220	100%	0.0	99%
Site 4	AQ	681	<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i> sp.	EU876663.1	994	93%	0.0	95%
Site 1	CT	559	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	FJ796454.1	993	98%	0.0	100%
Site 2	DP	330	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	BA000040.2	292	98%	1,00E-57	77%
Site 2	S	380	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	FJ84890.1	645	100%	0.0	98%
Site 4	AT	630	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	EU481826.1	1117	99%	0.0	99%
Site 3	BR	458	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. liaoningense</i>	FJ418695.1	765	97%	0.0	98%
Site 2	AG	641	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. yuanmingense</i>	FJ540938.1	1216	100%	0.0	100%
Site 4	AK	601	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. yuanmingense</i>	FJ785218.1	1058	99%	0.0	99%
Site 4	AP	674	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. yuanmingense</i>	FJ540938.1	1216	100%	0.0	100%
Site 1	GY	756	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	AB367699.1	1344	99%	0.0	99%
Site 1	M	400	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ193499.1	697	100%	0.0	99%
Site 3	BT	652	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	AM179839.1	1122	97%	0.0	99%
Site 3	GJ	620	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ418929.1	1106	99%	0.0	99%
Site 4	IS	389	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FJ555232.1	621	98%	7,00E-175	95%
Site 2	P	676	<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i>	AY741358.1	1092	94%	0.0	98%
Site 1	EM	650	<i>Burkholderia</i>	<i>B. sediminicola</i>	EU035613.1	1137	100%	0.0	98%
Site 1	AC	430	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	EU184087.1	756	100%	0.0	99%
Site 1	N	706	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ422401.1	1160	95%	0.0	98%
Site 2	DF	684	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	AY178062.1	1110	95%	0.0	98%
Site 2	IK	1161	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	AF247494.1	1331	82%	0.0	94%
Site 2	Y	676	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ025138.1	1110	96%	0.0	98%
Site 3	HX	674	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ434110.1	1157	99%	0.0	98%
Site 3	IF	690	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	EF149008.1	1097	95%	0.0	97%
Site 4	IC	657	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	AY178058.1	1137	100%	0.0	98%
Site 2	FD	649	<i>Curtobacterium</i>	<i>C. citreum</i>	FJ823008.1	1150	98%	0.0	99%
Site 2	U	643	<i>Curtobacterium</i>	<i>C. citreum</i>	FJ823008.1	1119	99%	0.0	99%
Site 1	EO	410	<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	FJ388230.1	731	100%	0.0	99%
Site 2	CV	1071	<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	EU741027.1	1479	89%	0.0	98%
Site 4	ES	644	<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	EU741027.1	1150	99%	0.0	99%
Site 4	IV	631	<i>Micrococcus</i>	<i>M. luteus</i>	FJ816022.1	1139	100%	0.0	100%
Site 3	FI	470	<i>Microlunatus</i>	<i>M. panaciterrae</i>	AB271051.1	805	98%	0.0	98%
Site 3	BS	780	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea</i> sp.	EU780667.1	1219	98%	0.0	98%
Site 4	IL	671	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fulva</i>	FJ807483.1	1198	99%	0.0	99%
Site 2	CY	410	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. moorei</i>	FM955889.1	710	100%	0.0	99%
Site 2	CZ	1059	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ719357.1	1546	86%	0.0	98%
Site 4	HR	687	<i>Roseomonas</i>	<i>R. gilardii</i>	AY220740.1	939	86%	0.0	94%
Site 4	AS	666	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>	AB272355.1	1166	100%	0.0	98%
Site 3	FG	640	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. yunnanensis</i>	EU730917.1	1150	99%	0.0	100%
Site 2	FC	641	<i>Williamsia</i>	<i>W. serinedens</i>	AM283464.1	1135	100%	0.0	99%



***Costularia arundinacea******Costularia nervosa***

**Figure 4.2.** Structure des populations de rhizobactéries isolées au contact des racines de *C. arundinacea* et *C. nervosa*, fréquence des principaux genres identifiés

**Tableau 4.7.** Nombre de bactéries appartenant aux 15 genres bactériens identifiés au sein des racines des deux espèces de *Costularia* prélevées dans 4 sites de maquis

Genres bactériens résultats de Blast-N	Espèces végétales	
	<i>C. arundinacea</i>	<i>C. nervosa</i>
<i>Acinetobacter</i>	1	2
<i>Aurantimonas</i>	1	0
<i>Azorhizobium</i>	0	1
<i>Bradyrhizobium</i>	14	13
<i>Burkholderia</i>	10	10
<i>Curtobacterium</i>	7	5
<i>Methylobacterium</i>	3	0
<i>Micrococcus</i>	2	1
<i>Microlunatus</i>	0	1
<i>Pantoea</i>	3	1
<i>Pseudomonas</i>	3	2
<i>Roseomonas</i>	0	1
<i>Serratia</i>	0	1
<i>Sphingomonas</i>	4	1
<i>Williamsia</i>	2	1

#### 4.3.6.2. Recherche de la présence de déterminants moléculaires par amplification des gènes de résistance au nickel *nreB* et *cnrA*

Les résultats indiquent que sur les 84 souches isolées aptes à pousser sur un milieu contenant 1 mM de nickel, 22 souches présentent une amplification de la séquence *cnrA*, 6 une amplification de la séquence *nreB*, 16 présentent les deux amplifications et 40 souches ne présentent aucune amplification avec ces deux couples d'amorces. Aucune corrélation significative n'est obtenue entre la détection moléculaire des déterminants de résistance et les résultats de tolérance au nickel en milieu de culture (Tableau 4.4). En effet, les trois combinaisons de marqueurs moléculaires, *nreB* seul, *cnrA* seul et *nreB* couplé à *cnrA*, sont identifiées comme capable de résister à des concentrations supérieures à 15 mM de nickel (Tableau 4.4). Il apparaît également que toutes les souches possédant les deux déterminants (*nreB* et *cnrA*) résistent à plus de 3 mM de nickel soluble. Les résultats indiquent également que 65% des souches de *Bradyrhizobium* et 80% des souches de *Burkholderia* présentent soit *nreB*, soit *cnrA*, soit les deux déterminants de résistance et que parmi ces deux genres, certaines souches résistantes au nickel ne possèdent aucun de ces deux déterminants de résistance.

### 4.4. Discussion

#### 4.4.1. Densité des populations de rhizobactéries sur sols ultramafiques

Les densités des populations bactériennes aérobies, hétérotrophes, isolées des racines de *Costularia arundinacea* et de *C. nervosa* sont faibles ( $1,8 \times 10^4$  à  $1,8 \times 10^5$  CFU/g racine) comparées aux densités fréquemment trouvées sur les racines des plantes agricoles (Marschner 1995 ; Stengel et Gelin 1998). En revanche, ces densités de bactéries associées aux racines des *Costularia* sont globalement comparables à celles obtenues par Schlegel (1991) ( $10^5$  CFU/g sol), Mercky (1998) ( $10^6$  CFU/g sol) et Amir et Pineau (1998) ( $10^5$  CFU/g sol) dans les sols rhizosphériques des environnements de maquis miniers calédoniens. La proportion des bactéries résistantes à 1 mM de nickel par rapport au nombre total des bactéries cultivées est homogène (40%) entre les différentes modalités (sites, espèces), indiquant que la tolérance aux fortes concentrations en nickel des bactéries

rhizosphériques de *Costularia* est une condition écologique constante et standard. Ceci est confirmé par les résultats obtenus sur des populations de bactéries isolées des racines (Barzanti et al. 2007 ; Chaintreuil et al. 2007 ; Pal et al. 2004) et des sols (Mengoni et al. 2001 ; Stoppel et Schlegel 1995) d'autres environnements ultramafiques. Ces résultats confirment l'importance, reconnue assez récemment, de la résistance de nombreux microorganismes aux métaux solubilisés pour assurer leur survie (Mergeay 1995).

Dans notre étude, comme dans celle de Schlegel (1991), une importante proportion des bactéries de la rhizosphère est sensible à 1 mM de  $\text{NiCl}_2$ , indiquant que certains facteurs abiotiques de la rhizosphère pourraient diminuer l'influence du nickel sur les populations bactériennes. En effet, l'apport de matière organique améliore la structure du sol et réduit l'effet toxique des ions métalliques par adsorption (Mercky 1998). La plante, par l'intermédiaire des composés organiques relargués par les cellules racinaires, pourrait alors jouer un rôle de protecteur des bactéries vis-à-vis du nickel (Glick et al. 1999 ; Hallmann et al. 1997 ; Rosenblueth et Martinez-Romero 2006). De plus, dans un sol nu, la non disponibilité du carbone est un facteur important limitant l'activité microbienne. La matière organique produite par les plantes est l'un des facteurs les plus importants du développement des populations de microorganismes rhizosphériques (Hery et al. 2005a ; Mercky 1998). Ainsi, la plante crée des sites privilégiés pour l'habitat et la nutrition des rhizobactéries. Le développement des plantes remédie de la sorte au manque de matière organique drastique de certains sols miniers, permettant d'augmenter les densités bactériennes des sols, compensant ainsi leur faible fertilité. De même, Amir et Pineau (1998) et Herrera et al. (2007) ont montré la stimulation de la flore bactérienne dans la rhizosphère de plantes endémiques des sols ultramafiques calédoniens.

De plus, les teneurs en nickel soluble entre les sites étudiés indiquent qu'une variation d'un facteur cinq ( $\text{Ni-DTPA}$  site 1 :  $53 \text{ mg kg}^{-1}$  et site 4 :  $261 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ne modifie pas la structure et la densité des populations bactériennes rhizosphériques. Ce résultat appuie l'hypothèse selon laquelle le cortège de bactéries des rhizosphères semble plus affecté par d'autres facteurs environnementaux que par les teneurs en nickel des sols (Amir et Pineau 1998 ; Angle et al. 1996).

#### 4.4.2. Caractérisation de la tolérance au nickel des rhizobactéries

Nos résultats attestent de l'abondance des bactéries tolérantes au nickel dans les sols étudiés, bien qu'elles diffèrent significativement dans leurs degrés de résistance. En effet généralement, le nombre de souches bactériennes isolées, résistantes au nickel, décroît avec l'augmentation de la concentration de nickel soluble dans le milieu de culture (Mengoni et al. 2001 ; Pal et al. 2004). Un certain nombre de souches isolées en Nouvelle-Calédonie semblent avoir un haut potentiel de résistance (supérieur à 15 mM) en comparaison avec d'autres études sur sols ultramafiques, par exemple en Italie, 7-10 mM (Mengoni et al. 2001) et en Inde, 7 mM (Pal et al. 2004). Ce potentiel se rapproche de celui estimé par Schlegel et al. (1991) en Nouvelle-Calédonie, (10-20 mM).

Stoppel et Schlegel (1995) décrivent plusieurs classes de déterminants de résistance au nickel dans les bactéries des sols néo-calédoniens par la méthode d'hybridation moléculaire qui a la capacité d'hybrider les homologues des opérons *cnr* et *nre*. Un de leur résultat remarquable est que l'opéron *nre* est trouvé uniquement en combinaison avec les opérons du groupe *cnr/ncc* mais jamais seul, alors que notre étude décèle à 6 reprises l'opéron *nre* seul. La méthode d'identification par amplification moléculaire des déterminants *cnrA* et *nreB* utilisés dans notre étude est plus sélective et ne détecte pas les opérons *ncc*, homologue de *cnr*, ce qui expliquerait cette contradiction apparente. D'autre part ces mêmes auteurs, plusieurs souches isolées résistantes au nickel ne présentent aucune amplification des deux déterminants, indiquant sans doute la présence d'autres déterminants moléculaires de résistance au nickel dans leur génome (Stoppel et Schlegel 1995)

#### 4.4.3. Diversité génétique globale des bactéries cultivables associées aux racines de *C. arundinacea* et de *C. nervosa*

Nos résultats suggèrent que la flore bactérienne au contact des racines des *Costularia* a évolué vers une domination de quelques groupes majeurs incluant différents genres de Proteobactéries hautement résistants au nickel. Cependant, il est possible que les méthodes de culture utilisées pour l'isolement des bactéries puissent pervertir partiellement les proportions effectives des groupes bactériens en favorisant certains groupes plutôt que d'autres. Cependant, nos résultats sont par

ailleurs en accord avec le fait que la rhizosphère des sols ultramafiques est colonisée en majorité par des Alpha et Bêta Protéobactéries (Abou-Shanab et al. 2007 ; Hery et al. 2004, 2005a ; Mengoni et al. 2004 ; Mercky 1999 ; Stoppel et Schlegel 1995). La structure des populations de Protéobactéries des racines des deux espèces de *Costularia* est identique et dominée par deux genres bactériens, *Bradyrhizobium* et *Burkholderia*. De nombreuses souches de ces deux genres principaux sont capables de se développer sur des milieux à forte concentration en nickel, confirmant ainsi le potentiel de tolérance des Protéobactéries rhizosphériques des sols calédoniens (Chaintreuil et al. 2007 ; Stoppel et Schlegel 1995).

#### **4.4.4. Diversité génétique des bactéries associées aux racines intervenant dans la nutrition des *Costularia***

Parmi les bactéries isolées au contact des échantillons de racines, 21 isolats appartenant aux genres *Bradyrhizobium* (3), *Burkholderia* (5), *Curtobacterium* (2) *Pseudomonas* (4), *Acinetobacter* (2), *Pantoea* (1) apparaissent capables de solubiliser le phosphate des milieux de culture TCP. Plusieurs auteurs rapportent les promotions de croissance des plantes par inoculation de bactéries capables de solubiliser le phosphore inorganique par échange de ligand avec les acides organiques qu'elles sécrètent dans la rhizosphère (Kumar et Narula 1999 ; Rodriguez et Fraga 1999 ; Vessey 2003 ; Richardson et al. 2009). Certaines souches PGPR, sélectionnées par d'autres auteurs pour leur utilisation en agriculture, appartiennent aux mêmes genres que celles isolés de nos échantillons : *Bradyrhizobium* (Antoun et al. 1998), *Pseudomonas* (Chabot et al. 1993 ; Illmer et Schinner 1992 ; Rodriguez et Vessely 2008), *Burkholderia* (Anandham et al. 2007), *Curtobacterium* (Antoun et Prevost 2006), *Methylobacterium* (Pan et al. 2002), *Micrococcus* (Rodriguez et Fraga 1999), *Sphingomonas* (Lodewyckx et al. 2002).

Les souches AT, BB, BO, AH, DP, IT et X ont été caractérisées comme solubilisatrices de phosphates et sont toutes proches de l'espèce *B. japonicum*. Une dizaine d'espèces de *Bradyrhizobium* (Alpha-Protéobactéries) ont été décrites à ce jour dont *B. japonicum* qui, grâce à sa capacité à former des nodules avec le soja, est l'une des bactéries les plus exploitées commercialement. Antoun et al. (1998) indiquent que certaines souches de *Bradyrhizobium* ont le potentiel pour être utilisées comme PGPR sur des plantes non légumineuses. Les bactéries du genre *Burkholderia*, proches du genre *Pseudomonas*, sont des Bêta-Protéobactéries. Elles

forment un ensemble de bactéries qui colonisent une très large variété de niche écologique (Coenye et Vandamme 2003). Certaines espèces de *Burkholderia* sont étudiées pour leurs capacités à réhabiliter le sol des friches industrielles chimiques, tandis que d'autres espèces présentent un intérêt dans les cultures pour leurs rôles bénéfiques au niveau de la rhizosphère (Vandamme et al. 2007). Par ailleurs, certaines souches de *Burkholderia* sont des bactéries fixatrices d'azote associées aux plantes (Moulin et al. 2001).

Comme l'a aussi constaté Mercky (1998), aucune souche de bactérie PGPR fixatrice libre d'azote du genre *Azospirillum* (Bashan et al. 2004) n'a été isolée dans notre étude. Il est possible que ce genre ne soit pas présent dans les sols rhizosphériques ultramafiques néo-calédoniens à fortes contraintes, mais il est aussi possible que les populations bactériennes de ce genre n'aient pas été détectées avec les méthodes utilisées. Il semble difficile d'admettre que les diverses bactéries fixatrices d'azote, mises en évidence par l'étude de diversité génétique (*Bradyrhizobium*, *Burkholderia*...), ne jouent aucun rôle dans la nutrition azotée des *Costularia*. En effet, certaines valeurs d'ARA obtenues dans notre étude indiquent qu'il y a une activité nitrogénase, par des fixateurs libres d'azote, dans certains échantillons de sols rhizosphériques et de racines que nous avons testés. Cette activité détectée dans quatre échantillons est indépendante des ajouts de glucose dans le système expérimental et elle est toujours détectée après deux heures d'incubation dans l'acétylène. Mercky (1998) a également détecté des activités nitrogénase sur des bactéries rhizosphériques de *Costularia*, mais en condition de laboratoire où la nutrition et les compétitions entre bactérie sont différentes des conditions de sol. Nos expériences sur du matériel frais prélevé en milieu naturel, montrant de faible valeur de réduction d'acétylène comparable à des fixateurs libres (Malik et al. 1991 ; Park et al. 2005 ; Reis et al. 2000), sont parmi les premières à détecter des entrées d'azote par des fixations libres sur sol ultramafiques. La détection des petites quantités d'éthylène par cette méthode n'étant pas statistiquement significative, des expériences complémentaires devront être effectuées indépendamment sur chaque souche isolée et sur les racines avec des temps d'incubation plus longs afin de permettre une détection plus fine des activités nitrogénasiques par les bactéries libres dans la rhizosphère des *Costularia*.

## 4.5. Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons caractérisé partiellement les populations bactériennes aérobies, hétérotrophes plus ou moins résistantes au nickel, isolées des racines de *Costularia arundinacea* et de *C. nervosa* pionnières des végétations de maquis sur sol ultramafique. Nous avons constaté que le pourcentage de bactéries résistantes à 1 mM de nickel apparaît homogène (40%) entre les deux espèces et indépendamment des localités. Les populations bactériennes des échantillons de racines des deux espèces de *Costularia* sont caractérisées par leur faibles densités et sont dominées par les Protéobactéries, tout particulièrement les genres *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* et *Curtobacterium*. Les souches EM, HE, HX de *Burkholderia* et AC de *Bradyrhizobium* montrent des caractéristiques particulièrement intéressantes en termes de fonctionnalité. En effet, ces quatre souches résistent à plus de 15 mM de nickel soluble et solubilisent le phosphate des milieux de culture TCP. Les deux déterminants moléculaires de résistance à Ni *nreB* et *cnrA* sont amplifiés avec la souche AC ; avec la souche HX seul *nreB* est amplifié et aucun déterminant n'est amplifié avec les souches HE et EM. Ces quatre souches pourront faire l'objet d'une caractérisation moléculaire plus approfondie, soit par l'étude des homologues moléculaires avec des amorces dégénérées (séquence consensus) permettant d'amplifier tous les variants des opérons des déterminants de résistance déjà identifiés (Stoppel et Schlegel 1995), soit par la méthode de mutation puis de clonage, permettant la recherche de nouveaux déterminants moléculaires de résistance au nickel.

Cette étude pourrait être le point de départ de recherches plus approfondies appliquées aux problématiques de revégétalisation. Le phosphore disponible étant un élément particulièrement limitant dans les sols ultramafiques calédoniens, la sécrétion d'acide organique dans la rhizosphère semble être un facteur primordial pour la solubilisation des phosphates complexés aux oxydes de fer. Le dosage de ces acides organiques excrétés par les bactéries solubilisatrices mises en évidence dans cette étude nous renseignerait sur les capacités effectives de ce mécanisme à solubiliser les phosphates du sol. Certaines des souches isolées dans ce travail peuvent présenter un intérêt pour optimiser le développement des *Costularia* utilisés en revégétalisation des sites miniers. La recherche de la production par les souches sélectionnées, d'autres métabolites bénéfiques à la croissance des plantes

(phytohormones, antibiotiques, sidérophores...) devra être conduite pour compléter les connaissances sur les capacités PGPR potentielles de ces souches. Des essais pourront ensuite être mis en œuvre, au laboratoire et en serre (Echbab et al. 2004), sur les différentes souches de Protéobactéries sélectionnées dans ce travail, pour valider les effets PGPR de ces souches sur le développement aux premiers stades de la plantule et sur la croissance des espèces de *Costularia*.

Plusieurs études démontrent l'influence bénéfique d'un inoculum contenant une combinaison de bactéries PGPR (Antoun et Prevost 2006). Des phénomènes d'interaction entre les bactéries PGPR et les champignons mycorhiziens, influençant la croissance des plantes, sont également largement décrits (Jones et al. 2004 ; Barriuso et al. 2008 ; Sood 2003). Les études précédentes ont montré que les espèces du genre *Costularia* développent des racines "cluster" (Lambers 2006 ; Neumann et Martinoia 2002), et qu'elles développent également des associations mycorhiziennes fonctionnelles (Lagrange et al. 2009). Il y a probablement des interactions fonctionnelles entre la solubilisation des phosphates du sol, par la production et la sécrétion de grande quantité d'acides organiques bactériens et racinaires, et l'absorption par les endomycorhizes de ces phosphates solubilisés pour les transmettre ensuite à la plante (Antoun et Prevost 2006). De telles études seraient donc la suite logique des travaux encore fragmentaires présentés ici.





## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail pluridisciplinaire a permis d'intégrer des données pédologiques, microbiologiques et physiologiques sur les écosystèmes de maquis néo-calédoniens. Les résultats obtenus permettent de dégager des conclusions intéressantes sur les modes de nutrition des espèces du genre *Costularia* et sur les relations entre le sol, la plante et les microorganismes associés, préalable primordial à l'amélioration des techniques de revégétalisation des sites miniers.

### 1. Nutrition minérale des *Costularia* dans les écosystèmes de maquis calédoniens sur roches ultramafiques

#### 1.1. Géophytosociologie des Cyperaceae pionnières

L'analyse des relations sols/plantes de la toposéquence de Plum montre que les variations pédologiques influencent la diversité des espèces et l'organisation des formations végétales. Elle révèle également l'importance des strates herbacées de Cyperaceae au sein des deux différentes formations de maquis, identifiées comme écosystèmes latéritiques et saprolitiques. L'étude phytosociologique de ces deux écosystèmes révèle une différence de structure et de recouvrement de leur strate herbacée. Bien que la majorité des espèces de Cyperaceae présentes soient ubiquistes aux deux types de sols principaux (*Baumea deplanchei*, *Costularia pubescens*, *C. comosa*, *Lepidosperma perteres*, *Shoenus neocaledonicus*), deux espèces de *Costularia* (*Costularia nervosa*, *Costularia arundinacea*) apparaissent spécifiques du maquis sur saprolite alors qu'elles se développent à proximité du maquis sur latérite. L'existence d'écotypes au sein des espèces de *Costularia* est probable. Deux autres espèces pionnières ligneuses sont présentes uniquement sur les sols de l'écosystème saprolitique (*Myodocarpus nervatus* et *Geniostoma densiflorum*), dans des zones contiguës à l'écosystème latéritique. Ces deux principaux écosystèmes sont également marqués par leur pauvreté en éléments nutritifs induisant une faible productivité de la végétation comparée aux écosystèmes de maquis para-forestier. Ceci corrobore l'hypothèse déjà entrevue par plusieurs auteurs selon laquelle la spécificité des groupements végétaux est attribuée aux rôles primordiaux des facteurs chimiques du sol où ils s'implantent.

Les différences chimiques majeures entre les sols du maquis sur saprolite et les sols du maquis sur latérite sont marquées en particulier par la teneur plus forte en magnésium extractible (extraits DTPA et KCl) dans les sols saprolitiques. Ces différences suggèrent que les espèces endémiques installées sur sols ultramafiques possèdent diverses stratégies physiologiques liées à la tolérance aux métaux.

D'autres études géophytosociologiques sur des terrains récemment dégradés, mettant en relation les éléments disponibles des sols avec les différents faciès à Cyperaceae pionnières installées sur ces terrains, devront être réalisées dans les futures zones à réhabiliter. Ces informations écologiques sont la base fondamentale des études de sélection des espèces pour la revégétalisation. Elles permettront de mieux appréhender les travaux de revégétalisation par des espèces compétentes et adaptées aux substrats à réhabiliter. Une fois les espèces compétentes ciblées par les études géophytosociologiques, la production de semences et de plants à partir de pieds mères provenant des localités à restaurer devra alors être effectuée.

## **1.2. Effet de la fertilisation sur le développement de *C. comosa***

La croissance de *Costularia comosa* cultivée en plein champ répond positivement à la fertilisation azotée et phosphatée. Nos études soulignent que sa vigueur et sa vitesse de développement sont conditionnées par les nutriments disponibles du sol. Sur les colluviosols ferrallitiques ferritiques étudiés, les quantités d'intrants apportées permettant un gain de croissance et de fructification de *Costularia comosa* sont relativement faibles par rapport aux quantités utilisées lors d'essais agronomiques sur des espèces alimentaires introduites. Cet essai de fertilisation a permis de confirmer que le principal facteur limitant la croissance des *Costularia* dans ces sols est le phosphore. Cet essai a également mis en évidence qu'après deux ans de croissance sur des sols latéritiques, les rendements de production de graines sont satisfaisants avec la dose forte de fertilisant phosphaté testée (P2 : 500 kg/ha) et une dose de fertilisant azoté comprise entre 100 et 500 kg/ha. La dose de 500 kg/ha de fertilisant phosphaté apportée permet une augmentation conséquente des phosphates assimilables (15 mg/kg de sol) par rapport à la teneur initiale (5 mg/kg de sol). Cette augmentation d'un facteur 3 de la teneur en phosphore assimilable se répercute sur la croissance de la plante, et l'azote devient alors le facteur limitant. Dans ces conditions expérimentales, la fertilisation azotée (< 500 kg/ha) est faible devant la teneur initiale en azote total des

sols, cependant la libération lente de molécules azotées biodisponibles permet une meilleure assimilation de l'azote et un bon développement des *Costularia comosa*.

Il ressort aussi de cet essai que la fertilisation phosphatée, aux doses utilisées, stimule nettement la croissance, le développement complet et la mycorhization de *Costularia comosa*. En effet, les taux d'endomycorhization arbusculaire des *Costularia*, fertilisées avec des doses P2 de phosphate, apparaissent très supérieurs aux taux de mycorhization des plants qui n'ont pas eu de fertilisation. La mycorhization semble améliorer la croissance et l'adaptation au nickel de la plante, ce qui montre que cette Cyperaceae possède une certaine affinité vis-à-vis des AMF. La détermination plus approfondie des effets d'une fertilisation phosphatée sur la mycorhization de *Costularia*, en serre et sur le terrain, permettrait de vérifier si certaines doses de phosphate sont inductrices et, à l'inverse, si d'autres sont inhibitrices de la mycorhization. L'objectif serait de définir la gamme de concentration idéale en phosphate disponible, pour la formation d'une symbiose efficace sur la croissance de la plante.

### **1.3. Stratégies nutritives d'adaptation aux carences des sols ultramafiques des espèces du genre *Costularia***

Le caractère pionnier des Cyperaceae, largement observé lors des études botaniques des écosystèmes ultramafiques, n'avait jamais été caractérisé et les stratégies nutritives adoptées pour coloniser ces sols extrêmes étaient encore inconnues. Nos travaux ont mis en évidence trois stratégies nutritives présentes chez les *Costularia* inféodées aux formations de maquis, la symbiose mycorhizienne, le développement de racines "cluster" et les fonctions de solubilisation des phosphates par les bactéries de la rhizosphère créant des conditions favorables d'assimilation du phosphore pour la plante. Ces trois stratégies de nutrition phosphatée sont probablement nécessaires aux Cyperaceae pour coloniser les sols ultramafiques.

#### **1.3.1. Statut mycorhizien des Cyperaceae pionnières et rôle de la mycorhization arbusculaire sur le développement de *Costularia comosa***

L'analyse des taux de mycorhization *in situ* des Cyperaceae des sols ultramafiques néo-calédoniens montre qu'elles sont associées à des champignons mycorhiziens à arbuscules. Cependant la caractérisation du statut endomycorhizien de neuf espèces de Cyperaceae pionnières des formations de maquis a mis en

évidence la faible mycorhization de ces espèces. Les espèces du genre *Costularia* ont la plus forte fréquence de mycorhization. Les expériences de mycorhization en conditions contrôlées par une souche pure (SFONL), isolée de sol ultramafique calédonien et connue pour promouvoir la croissance des plantes, indiquent que la biomasse des plants de *Costularia comosa* est positivement corrélée avec le taux de colonisation endomycorhizienne des racines. Les résultats confirment que la faible colonisation mycorhizienne est fonctionnelle avec un taux de croissance chez *Costularia comosa* mycorhizé avec SFONL 2,8 fois supérieur au témoin non-mycorhizé pendant la première année. Cette augmentation de biomasse et le maintien de la concentration en azote et en phosphore dans les différents tissus de la plante sont liés à une augmentation de la quantité de phosphore et d'azote prélevée dans le milieu. En revanche cette colonisation réduit 2,5 fois la concentration en nickel dans les racines, suggérant un rôle barrière du champignon mycorhizien pour "l'évitement" du nickel dans les tissus.

Ce travail établit que les structures endomycorhiziennes à arbuscules décrites chez les espèces de Cyperaceae des maquis calédoniens sont fonctionnelles et permettent une augmentation de croissance de la plante. C'est à notre connaissance la première fois qu'un tel effet est observé chez les Cyperaceae. Cette étude doit être complétée par une meilleure connaissance de la diversité et de la structure des populations de champignons arbusculaires dans les rhizosphères de différentes espèces de *Costularia*, ainsi que l'analyse des conditions qui permettent d'optimiser la mycorhization. Ces études permettront de mieux comprendre le rôle de cette symbiose dans l'organisation écologique des strates à Cyperaceae et dans l'adaptation des plantes aux terrains ultramafiques.

### **1.3.2. Présence de racines dauciformes chez les Cyperaceae pionnières des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie**

Les 9 espèces de Cyperaceae, à caractère pionnier, étudiées *in situ* développent des racines dauciformes, ainsi que l'ensemble des *Costularia comosa* prélevé et analysé pendant les expérimentations de mycorhization en serre. Les racines dauciformes sont connues pour être impliquées dans l'assimilation des phosphates. Ces structures racinaires sont considérées comme une adaptation aux conditions de carence en phosphore de la plante et sont uniquement présentes chez certains genres de Cyperaceae poussant dans des conditions de faible concentration en

phosphore biodisponible. La maturation rapide des racines dauciformes, jumelée à un pic d'exudation de carboxylates (citrate, malate) provoque par échange de ligands la libération des phosphates complexés aux cations et oxydes du sol, permettant ensuite, par l'intermédiaire de ces structures racinaires renflées, une meilleure assimilation des phosphates. Ce développement rapide des racines "cluster" (1 à 3 jours) semble être un avantage adaptatif aux conditions de nutrition phosphatée limitantes, particulièrement en saison sèche où le développement de mycorhizes actives, qui requiert habituellement une période de temps plus importante, est inhibé par des périodes de pluie limitées. Ces racines dauciformes permettent d'explorer les micro-niches au contact direct des racines alors que les mycorhizes explorent souvent des zones du sol plus lointaines, attestant des capacités diverses et importantes d'exploration du sol par les plants de *Costularia*. Ainsi, au vu du développement rapide et de la courte vie de ces structures dauciformes (quelques semaines), on peut supposer que des changements rapides et continus de l'interface sol-racine dauciforme s'opèrent et permettent l'exploration de nouvelles niches à phosphore.

### **1.3.3. Diversité des rhizobactéries de deux espèces du genre *Costularia* inféodées aux formations de maquis**

Dans cette étude, nous avons présenté une description des populations bactériennes aérobies, hétérotrophes et résistantes au nickel, isolées des racines de *Costularia arundinacea* et de *C. nervosa* pionnières des végétations de maquis sur sol ultramafique. Il s'avère que le cortège des rhizobactéries cultivables isolées en laboratoire à partir de broyats racinaires apparaît composé de genres similaires à ceux trouvés dans des sols classiques non ultramafiques. Nous avons constaté que les proportions des Unités Formant Colonies (UFC) totales et celles résistantes à 1 mM de nickel soluble apparaissent homogènes (40%) entre les deux espèces et indépendamment des localités étudiées. Les populations bactériennes associées aux racines des deux espèces de *Costularia* sont de faibles densités et dominées par les Protéobactéries, notamment par les genres *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* et *Curtobacterium*. Certaines des souches isolées présentent des caractéristiques particulièrement intéressantes en termes de fonctionnalité. En effet, elles résistent à plus de 15 mM de nickel soluble et possèdent la capacité de solubiliser les phosphates des milieux de culture Tri-Calcium-Phosphate (TCP).

L'étude de la nature et le dosage des acides organiques excrétés par les racines des *Costularia* et par les bactéries rhizosphériques solubilisatrices sélectionnées dans cette étude nous renseigneraient davantage sur les capacités effectives de ce mécanisme à solubiliser les phosphates liés aux sols.

Des recherches destinées à identifier la synthèse par les bactéries de métabolites bénéfiques à la croissance des plantes (phytohormones, antibiotiques, sidérophores) seraient également à mener sur les rhizobactéries isolées et consignées dans ce travail, afin de sélectionner celles potentiellement promotrices de croissance des plantes (PGPR). Au vu des travaux dans ce domaine, l'AIA (acide indol-3-acétique : auxine), produite par les rhizobactéries, constitue sans doute la plus intéressante à retenir pour l'analyse, car elle est une hormone de croissance parmi les plus importantes pour la promotion du développement des plantes.

#### 1.4. Conclusion

Ce travail de thèse a donc permis d'entrevoir quelques mécanismes d'adaptation des plantes endémiques pionnières aux sols ultramafiques. Les plantes endémiques de ces écosystèmes, naturellement en contact depuis des millions d'années avec de fortes teneurs en métaux, en particulier en nickel, ont développé des adaptations spécifiques à long terme pour se protéger de leurs effets toxiques, laissant les nutriments disponibles conditionner leur vitesse de croissance. Ainsi, le déterminisme de leur développement semble dépendre de l'interaction entre les caractères d'adaptation aux fortes teneurs en métaux biodisponibles et les caractères d'adaptation aux faibles concentrations en nutriments essentiels.

En outre, les *Costularia* ont la faculté de réallouer efficacement les principaux nutriments des tissus sénescents, suggérant leur capacité à moduler leur vitesse de croissance selon la disponibilité des nutriments du sol et principalement du phosphore. L'union des trois stratégies nutritives décrites (racines dauciformes, mycorhizes et rhizobactéries) et les possibilités d'assimilation qui en résultent permettent de rendre compte de la meilleure capacité des Cyperaceae pionnières à mobiliser le phosphore. Ces stratégies expliquent sans doute l'adaptation des Cyperaceae à coloniser les sols nus. Elles font de ces *Costularia* endémiques, les plantes cibles idéales pour la réhabilitation écologique des sites miniers exploités. Le choix des espèces de Cyperaceae se fera selon les sols à réhabiliter, en utilisant une

fertilisation favorable à un développement optimal des plantes et des microorganismes associés.

## **2. Applications à la restauration des sites miniers : perspectives d'utilisation de microorganismes adaptés aux sols ultramafiques**

Notre travail confirme le rôle important des microorganismes mycorhiziens et bactériens pour la croissance des *Costularia*. Plusieurs études démontrent ainsi l'influence bénéfique sur la croissance des plantes d'un inoculum contenant une combinaison de bactéries PGPR. Certaines des souches isolées dans notre expérimentation présentent un intérêt indéniable pour optimiser le développement des plants de *Costularia* utilisés en revégétalisation des sites miniers. Après sélection de rhizobactéries potentiellement PGPR, des essais pourront être réalisés en serre et au laboratoire pour valider les effets PGPR d'inoculum de ces souches sur le développement aux premiers stades de la plante et sur la croissance des espèces de *Costularia*. D'autres essais, avec l'application concomitante de champignons mycorhiziens à arbuscules et de souches de rhizobactéries isolées de sol ultramafique, viendront comparer l'effet combiné de ces différents microorganismes sur la croissance et la vigueur de *Costularia*. Enfin, il faudra également envisager des essais en pépinière pour étudier l'effet de ces microorganismes sur une plus large production de plants de *Costularia*. En effet, l'inoculation fongique et bactérienne des plantes pourrait également être effectuée par ajout de sol ultramafique rhizosphérique de qualité dans le substrat de culture en pépinière.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules étant des symbiotes obligatoires, l'étude de la faisabilité d'un enrobage des graines avec des propagules de champignons mycorhiziens serait important pour son utilisation en restauration écologique. L'objectif serait d'associer avec efficacité des semences pré-germées et des propagules mycorhiziennes par enrobage et de les incorporer dans un mélange de semis hydrauliques, afin qu'une fois en place sur le site à revégétaliser, la jeune racine et le champignon forment au plus vite la symbiose. L'enrobage permettrait par ailleurs de réduire considérablement les apports d'inoculum mycorhizien, délicat à produire.





## Références bibliographiques

- Abbott LK, Murphy DV (2003) Soil Biological Fertility: A key to sustainable land use in agriculture. Springer Netherlands Editions 264 p
- Abbott LK, Robson AD, Scheltema MA (1995) Managing soils to enhance mycorrhizal benefits in Mediterranean agriculture. *Critical Review in Biotechnology* 15:213-228
- Abou-Shanab RAI, van Berkum P, Angle JS (2007) Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68:360-367
- Abou-Shanab RAI, Delorme TA, Angle JS, Chaney RL, Ghanem K, Moawad H, Ghazlan HA (2003) Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *International Journal of Phytoremediation* 5:367-379
- Al-Karaki G (2002) Benefit, cost and phosphorus use efficiency of mycorrhizal field-grown garlic and different soil phosphorus levels. *Journal of Plant Nutrition* 25:1175-1184
- Alloush GAZ, Zeto SK, Clark RB (2000) Phosphorus source, organic matter, and arbuscular mycorrhiza effects on growth and mineral acquisition of chickpea grown in acidic soil. *Journal of Plant Nutrition* 23:1351-1369
- Amir H, Jasper DA, Abbott LK (2008) Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. *Mycorrhiza* 19:1-6
- Amir H, Lagrange A (2008) Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonia ultramafic soils improve the tolerance to nickel of endemic plant species. Sixth International Conference on Serpentine Ecology, June 16-23, Bar Harbor, Maine, USA
- Amir H, Pineau R (1998) Influence of plants and cropping on microbiological characteristics of some New Caledonian ultramafic soils. *Australian Journal of Soil Research* 36:457-471
- Amir H, Pineau R (2003) Relationship between extractable Ni, Co and other metals and some microbiological characteristics of different ultramafic soils from New Caledonia. *Australian Journal of Soil Research* 4:215-228
- Anandham R, Choi HK, Gandhi PI, Yim WJ, Park SJ, Kim KA, Madhaiyan M, Sa TM (2007) Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:1121-1129
- Andreasen JK, O'Neill RV, Noss R, Slosser NC (2001) Considerations for the development of a terrestrial index of ecological integrity. *Ecological Indicators* 1:21-35
- Angle JS, Gagliardi JV, McIntosh MS, Levin MA (1996) Enumeration and expression of bacterial counts in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 9:233-251
- Angleviel F (2003) Historiographie de la Nouvelle-Calédonie: ou l'émergence tardive de deux écoles historiques antipodéennes. Publibook (eds), France 362 p
- Angleviel F (2006) Histoire de la Nouvelle-Calédonie : nouvelles approches, nouveaux objets. L'Harmattan, Paris 350 p
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204:57-67
- Antoun H, Kloepper JW (2001) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Encyclopedia of Genetics*, Academic Press 49 p

- Antoun H, Prévost D (2006) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Springer. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Dordrecht, The Netherlands p 38
- Aronson J, Clewell AF, Blignaut JN, Milton SJ (2006) Ecological restoration: A new frontier for nature conservation and economics. *Journal for Nature Conservation* 14:135-139
- Arvieu JC, Leprince F, Plassard C (2003) Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to P-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Annals of Forest Science* 60:815-821
- Attiwill PM, Adams MA (1993) Nutrient cycling in forests. *New Phytologist* 124:561-582
- Augé RM (2001). Water relations, drought and vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42
- Azcon-Aguilar C, Barea JM (1997) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture, significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68:1-24
- Bago B, Vierheilig H, Piché Y, Azcón-Aguilar C (1996) Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist* 133:273-280
- Baker AJM, Proctor J, van Balgooy MMJ, Reeves DR (1992) Hyperaccumulation of nickel by the flora of the ultramafics of Palawan, republic of the Philippines. In: Baker AJM, Proctor J, Reeves DR (eds) The vegetation of ultramafic (serpentine) soils. Proceedings of the first international conference on serpentine ecology, Andover pp 291-304
- Barnaud G (1995) A l'interface de la pratique et de la théorie : l'écologie de la restauration. *Natures Sciences Sociétés* 3:36-50
- Barriuso J, Ramos Solano B, Santamaria C, Daza A, Gutierrez Manero FJ (2008) Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of Applied Microbiology* 105:1298-1309
- Barthlott W, Lauer W, Placke A (1996) Global distribution of species diversity in vascular plants: towards a world map of phytodiversity. *Erdkunde* 50:317-326
- Barazani O, Friedman J (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology* 25:2397-2406
- Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbriellini R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A (2007) Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology* 53:306-316
- Bashan Y, Holguin G (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Canadian Journal of Microbiology* 43:103-121
- Bashan Y, Holguin G, Bashan LE (2004) *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50:521-577
- Bazin P, Barnaud G (2002) Du suivi à l'évaluation : à la recherche d'indicateurs opérationnels en écologie de la restauration. *La Terre et la Vie Revue d'écologie* 9:201-224
- Becquer T, Bourdon E, L'Huillier L (1997) Mobilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques du Sud de la Nouvelle-Calédonie. Dans : Jaffré T, Reeves RD, Becquer T (eds) Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères. ORSTOM, Noumea pp 155-162
- Becquer T, Quantin C, Rotte-Capet S, Ghanbaja J, Mustin C, Herbillon AJ (2006) Sources of trace metals in Ferralsols in New Caledonia. *European Journal of Soil Science* 57:210-213
- Becquer T, Quantin C, Sicot M, Boudot JP (2003) Chromium availability in ultramafic soils from New Caledonia. *Science of the Total Environment* 301:251-261
- Bellgard SE (1991) Mycorrhizal associations of plant-species in Hawkesbury sandstone vegetation. *Australian Journal of Botany* 39:357-364
- Black CA (1993) Soil fertility evaluation and control. Lewis Publishers, London p 746

- Boddey RM, Dobereiner J (1995) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fertilisation Research* 42 :241-250
- Bonzon B, Edighoffer S, L'Huillier L, Bourdon E, Becquer T (1997) Facteurs de la fertilité et conditions de mise en valeur des sols ferrallitiques ferritiques du Sud de la Grande-Terre: problématique de leur étude. Dans : Jaffré T, Reeves RD and Becquer T (eds) *Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères*, ORSTOM, Noumea pp 39-47
- Boukcim H, Mousain D (2001) Effets de la fertilisation phosphatée sur la mycorhization, la croissance et la nutrition en phosphore et en azote de semis de Cèdre (*Cedrus atlantica* Manetti) inoculés en pépinière par *Tricholoma tridentinum* Sing. Var. *cedretorum* Bon. *Annals of Forest Science* 58:289-300
- Bourdon E, Becquer T, Edighoffer S, Bonzon B (1997) Caractérisation du comportement physique de deux types de faciès de sol ferallitiques issus de roches ultramafiques. Dans : Jaffré T, Reeves RD, Becquer T (eds) *Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères*, ORSTOM, Noumea pp 49-56
- Bradshaw AD (1984) Ecological principles and land reclamation practice. *Landscape Urban Plan* 11:35-48
- Bradshaw AD (1990) The reclamation of derelict land and the ecology of ecosystems. In: Jordan WR, Gilpin ME, Aber JD (eds) *Restoration ecology: A synthetic approach to ecological research*. Cambridge University Press, Cambridge pp 53-74
- Bradshaw AD (1997) Restoration of mined lands - using natural process. *Ecological Engineering* 8:255-269
- Brady KU, Kruckeberg AR, Bradshaw HD (2005) Evolution ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36:243-266
- Braun-Blanquet J (1932) *Plant Sociology: the Study of Plant Communities*. McGraw-Hill, New York 96 p
- Brimecombe MJ, de Leij F, Lynch JM (2001) The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The Rhizosphere*. New York pp 95-140
- Brooks RR (1987) *Serpentine and its vegetation: a multidisciplinary approach*. Dioscorides Press, Portland 454 p
- Bruhl JJ (1995) Sedge genera of the world: relationships and a new classification of the Cyperaceae. *Australian Systematic Botany* 8:125-305
- Brundrett MC (1991) Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research* 21:171-313
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154:275-304
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR (2000) Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology* 46:237-245
- Burgess BK, Lowe DJ (1996) Mechanism for molybdenum nitrogenase. *Chemical Review* 96:2983-3012
- Cavaglieri L, Orlando J, Etcheverry M (2007) Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiological Research* 26:321-328
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP (1993) Growth stimulation of corn and romaine lettuce by microorganisms solubilizing inorganic phosphorous. *Canadian Journal of Microbiology* 39:941-947
- Chaintreuil C, Rigault F, Moulin L, Jaffré T, Fardoux J, Giraud E, Dreyfus B, Bailly X (2007) Nickel resistance determinants in *Bradyrhizobium* strains from nodules of the endemic New Caledonia legume *Serianthes calycina*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:8018-8022
- Chapin FSIII (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:233-260
- Chapin FSIII, Autumn K, Pugnaire F (1993) Evolution of suites of traits in response to environmental stress. *American Naturalist* 142:78-92
- Chevillotte V, Chardon D, Beauvais A, Maurizot P, Colin F (2006) Long-term tropical morphogenesis of New Caledonia (southwest Pacific): importance of positive epeirogeny and climate change. *Geomorphology* 81:361-375
- Chiarucci A, Bonini I, Fattorini L (2003) Community dynamics of serpentine vegetation in relation to nutrient addition and climatic variability. *Journal of Mediterranean Ecology* 4:23-30

- Chiarucci A, Maccherini S (2007) Long-term effects of climate and phosphorus fertilization on serpentine vegetation. *Plant and Soil* 293:133-144
- Christians NE, Martin DP, Karnok KJ (1981) The interactions among N, P, K, on the establishment, quality and growth of Kentucky bluegrass. *Proceedings of the 4th International Turfgrass Research Conference*, Guelph, Canada pp 341-348
- Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18:117-143
- Clarke KR, Warwick RM (1994) *Changes in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. Natural Environment Research Council, Plymouth Marine Laboratory, UK p 144
- Coenye T, Vandamme P (2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 5:719-729
- Colin F, Brimhall G, Nahon D, Lewis C, Baronnet A, Danti K (1992) Equatorial rain forest lateritic mantles: A geomembrane filter. *Geology* 20:523-526
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4951-4959
- Connell JH, Lowman MD (1989) Low-diversity tropical rain forests: some possible mechanisms for their existence. *American Naturalist* 134:88-119
- Cooke JA, Johnson MS (2002) Ecological restoration of land with particular reference to the mining of metals and industrial minerals: A review of theory and practice. *Environmental Reviews* 10:41-71
- Coombs JM, Barkay T (2004) Molecular evidence for the evolution of metal homeostasis genes by lateral gene transfer in bacteria from the deep terrestrial subsurface. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1698-1707
- Crowley DE, Römhild V, Marschner H, Szaniszlo PJ (1992) Root-microbial effects on plant iron uptake from siderophores and phytosiderophores. *Plant and Soil* 142 :1-7
- Cuenca G, de Andrade Z, Meneses E (2001) The presence of aluminum in arbuscular mycorrhizas of *Clusia multiflora* exposed to increased acidity. *Plant and Soil* 231:233-241
- Dagnélie P (2003) *Principes d'expérimentation : planification des expériences et analyse de leurs résultats*. Presses agronomiques, Gembloux 397 p
- Dagnélie P (2008) Expérimentation agronomique et expérimentation industrielle. *Journal des Ingénieurs* 110:26-30
- Daily GC (1995) Restoring value to the world's degraded lands. *Science* 269:350-354
- Dale VH, Beyeler SC (2001) Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecological Indicators* 1:3-10
- Davies J, Briarty LG, Rieley JO (1973) Observations on the swollen lateral roots of the Cyperaceae. *New Phytologist* 72:167-174
- Derroire G, Lagrange A, Tassin J (2008) Flowering and fruiting phenology in maquis of New Caledonia. *Acta Botanica Gallica* 155:263-275
- Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159:371-394
- Dighton J (2001) The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. *Soil Science* 166:566-568
- Dobson C (2008) Ecological field studies: through field studies, students learn scientific process and ecological content. *The Science Teacher* 2/01/2008

- Dubus IG, Becquer T (2001) Phosphorus sorption and desorption in oxide-rich ferrasols of New Caledonia. *Australian Journal of Soil Research* 39:403-414
- Duwig C, Becquer T, Vogeler I, Vauclin M, Clothier B (2000) Water dynamics and nutrient leaching through a cropped Ferralsol in the Loyalty Islands (New Caledonia). *Journal of Environmental Quality* 29:1010-1019
- Echbab H, Prin Y, Ducouso M, Nourissier-Mountou S, Lahlou H, Arahou M (2004) Helper bacteria associated with *Casuarina cunninghamiana*-*Frankia* symbiosis : selection of isolates for their effects on plant growth in axenic conditions. *Acta botanica gallica* 151:429-440
- Edighoffer S (1993) Mise en valeur des sols ferrallitiques des massifs du Sud de la Nouvelle-Calédonie, Enquête sur le statut des nutriments et des métaux lourds chez les végétaux cultivés sur des faciès ferritiques. *Conventions sciences de la vie, Orstom Nouméa, Agropédologie* 23:1-115
- Eibl JM, Plunkett GM, Lowry PP (2001) Evolution of *Polyscias* sect. *Tieghemopanax* (Araliaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Adansonia* 23:23-48
- Enright NJ, Rigg L, Jaffré T (2001) Environmental controls on species composition along a (maquis) shrubland to forest gradient on ultramafics at Mont Do, New Caledonia. *South African Journal of Science* 97:573-580
- Ezawa T, Smith SE, Smith FA (2002) P metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil* 244:221-230
- Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF (2008) The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320:1034-1039
- Fitter AH, Moyersoen B (1996) Evolutionary trends in root-microbe symbioses. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 351:1367-1375
- Fomina M, Hillier S, Charnock JM, Melville K, Alexander J, Gadd GM (2005) Role of oxalic acid over excretion in transformation of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:371-381
- Forde B (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 465:219-235
- Franco LD, Maia RDC, Porto ALF, Messias AS, Fukushima K, de Campos-Takaki GM (2004) Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology* 35:243-247
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clausse ML, Courier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat JC, Garbaye J (2005) Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165:317-328
- Frontier S, Pichond-Viale D (1991) Ecosystèmes : structure, fonctionnement, évolution. Masson, Collection d'Ecologie 21:1-392
- Gai JP, Cai XB, Feng G, Christie P, Li XL (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi associated with sedges on the Tibetan plateau. *Mycorrhiza* 16:151-157
- Galloway JM, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland C, Green P, Holland E, Karl DM, Michaels AF, Porter JH, Townsend A, Charles V (2004) Nitrogen Cycles: Past, Present and Future. *Biogeochemistry* 70:153-226
- Ganzert C, Pfadenhauer J (1986) Seasonal dynamics of shoot nutrients in *Schoenus ferrugineus* (Cyperaceae). *Holarctic Ecology* 9:137-142
- Gauthier D, Jaffre T, Prin Y (2000) Abundance of *Frankia* from *Gymnostoma* spp. in the rhizosphere of *Alphitonia neocaledonica*, a non-nodulated Rhamnaceae endemic to New Caledonia. *European Journal of Soil Biology* 36:169-175
- Gavito ME, Miller MH, (1998) Early phosphorus nutrition, mycorrhizal development, dry matter partitioning and yield of maize. *Plant and Soil* 199:177-186
- George E, Häussler KU, Vetterlein D, Gorgus E, Marschner H (1992) Water and nutrient translocation by hyphae

- of *Glomus mosseae*. Canadian Journal of Botany 70:2130-2137
- Gianinazzi-Pearson V, Arnould C, Oufattole M, Arango M, Gianinazzi S (2000) Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. Planta 211:609-613
- Giroux M, Enright P (2002) Concentrations et charges d'azote et de phosphore perdues dans les drains souterrains selon les cultures et les modes de fertilisation. Site de Saint-Lambert-de-Lauzon. Cahiers de l'observatoire de la qualité des sols du Québec, Institut de recherche et de développement en agroenvironnement Inc 165 p
- Glick BR, Patten CL, Holguin H, Penrose DM (1999) Bio-chemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial College Press, London 267 p
- Goris J, De Vos P, Coenye T, Hoste B, Janssens D, Brim H, Diels L, Mergeay M, Kersters K, Vandamme P (2001) Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basileensis* Steinle et al. 1998 emend. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:1773-1782
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin HR, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Nature 435:819-823
- Grass G, Fan B, Rosen P, Lemke K, Schlegel HG, Rensing C (2001) NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. Journal of Bacteriology 183:2803-2807
- Greenwood DJ (1981) Crop response to agronomic practice. In : Rose DA, Edward CD (eds) Mathematics and plant physiology. Academic Press, London pp 195-216
- Griffiths BS, Bonkowski M, Dobson G, Caul S (1999) Changes in soil microbial community structure in the presence of microbial-feeding nematodes and protozoa. Pedobiologia 43:297-304
- Grime JP (1979) Plant strategies and vegetation processes. John Wiley and Sons Editions, London 456 p
- Grundmann GL (2004) Spatial scales of soil bacterial diversity - the size of a clone. FEMS Microbiology Ecology 48:119-127
- Guillaumin A (1938) Bulletin de la société botanique de France. Extrait : matériaux pour la flore de la Nouvelle-Calédonie. Révision des Cypéracées Tome 85, 47 p
- Gustafson DJ, Casper BB (2004) Nutrient addition affects AM fungal performance and expression of plant/fungal feedback in three serpentine grasses. Plant and Soil 259:9-17
- Hafliger E, Scholz H (1980) Grass Weeds. Document CIBA-GEIGY, Basel 183 p
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahafee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43:895-914
- Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G (2008) Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. Microbiological Research 163:234-242
- Harnett NM, Gyles CL (1984) Resistance to drugs and heavy metals, colicin production and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains. Applied Environmental Microbiology 48:930-935
- Harrington TJ, Mitchell DT (2002) Colonization of root systems of *Carex flacca* and *C. pilulifera* by *Cortinarius (Dermocybe) cinnamomeus*. Mycological Research 106:452-459
- Harris JA, Hobbs RJ, Higgs E, Aronson J (2006) Ecological restoration and global climate change. Restoration Ecology 14:170-176
- Harrison MJ (1996) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versicolor*. Nature 378:626-629
- Harrison MJ (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annual Review of Microbiology 59:19-42
- Hart TB (1990) Monospecific dominance in tropical rain forests. Trends in Ecology and Evolution 5:6-11
- Hawkins HJ, Johansen A, George E (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 226:275-285

- He XH, Critchley C, Bledsoe C (2003) Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:531-567
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394:431
- Helgason T, Fitter AH, Young JPW (1999) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular Ecology* 8:659-666
- Henry CP, Amoros C, Roset N (2002) Restoration ecology of riverine wetlands: a 5-year postoperation survey on the Rhône River, France. *Ecological Engineering* 18:543-554
- Herrera A, Hery M, Stach JEM, Jaffre T, Normand P, Navarro E (2007) Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *European Journal of Soil Biology* 43: 130-139
- Hery M (2004) Caractérisation des communautés bactériennes des sols extrêmes de Nouvelle-Calédonie : influence des principaux facteurs biotiques et abiotiques. Thèse, Université Claude Bernard – Lyon1 n° d'ordre 124-2004, 160 p
- Hery M, Herrera A, Vogel TM, Normand P, Navarro E (2005a) Effect of carbon and nitrogen input on the bacterial community structure of Neocaledonian nickel mine spoils. *FEMS Microbiology Ecology* 51:333-340
- Hery M, Philippot L, Meriaux E, Poly F, Le Roux X, Navarro E (2005b) Nickel mine spoils revegetation attempts: effect of pioneer plants on two functional bacterial communities involved in the N-cycle. *Environmental Microbiology* 7:486-498
- Heulin T, Berge O, Mavingui P, Gouzou L, Hebbar KP, Balandreau J (1994) *Bacillus polymyxa* and *Rahnella aquatilis*, the dominant N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with wheat rhizosphere in French soils. *European Journal of Soil Biology* 30:35-42
- Himelblau E, Amasino RM (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* 158:1317-1323
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced-chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321:117-152
- Hinsinger P, Plassard C, Tang CX, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248:43-59
- Hodge A (2000) Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Ecology* 32:91-96
- Hodge A, Campbell CD, Fitter AH (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413:297-299
- Howitt SM, Udvardi MK (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:152-170
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Welzel WW, Seissitsch A (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology* 70:2667-2677
- Illmer P, Schinner F (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 389-395
- Imsande J, Touraine B, (1994) N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* 105:3-7
- Jaffré T (1980) Etude écologique du peuplement végétal des sols dérivés de roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie. Travaux et Documents de l'ORSTOM, Paris 124 p



- Jaffré T (1992) Floristic and Ecological diversity of the vegetation on ultramafic rocks in New Caledonia. In: Baker AJM, Proctor J, Reeves RD (eds) The vegetation of ultramafic (serpentine) soils. Intercept, Andover, Oregon pp 101-107
- Jaffré T, Latham M (1974) Contribution à l'étude des relations sol-végétation sur un massif des roches ultrabasiques de la côte ouest de la Nouvelle-Calédonie : Le Boulinda. *Adansonia* 14:311-336
- Jaffré T, McCoy S, Rigault F, Dagostini G (1997) Quelle méthode de végétalisation pour la réhabilitation des anciens sites miniers de Nouvelle-Calédonie ? Dans : Jaffré T, Reeves RD, Becquer T (eds) *Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères*, ORSTOM, Noumea pp 285-288
- Jaffré T, McCoy S, Rigault F, Navarro E (2001b) A comparative study of flora and symbiotic microflora diversity in two *Gymnostoma* formations on ultramafic rocks in New Caledonia. *South African Journal of Science* 97:599-603
- Jaffré T, Morat P, Veillon JM, MacKee HS (1987) Changements dans la végétation de la Nouvelle-Calédonie au cours du Tertiaire : la végétation et la flore des roches ultrabasiques. *Adansonia* 9:365-391
- Jaffré T, Morat P, Veillon JM, Rigault F, Dagostini G (2001a) Composition and characterisation of the native flora of New Caledonia. IRD, Noumea 121 p
- Jaffré T, Pelletier B (1992) Plantes de Nouvelle-Calédonie permettant de revégétaliser des sites miniers. Brochure Société Le Nickel - SLN, Nouméa 114 p
- Jaffré T, Rigault F, Dagostini G (1998) Impact des feux de brousse sur les maquis ligno-herbacés des roches ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. *Adansonia* 20:173-189
- Jaffré T, Rigault F, Sarrailh JM (1994) La végétalisation des anciens sites miniers. *Bois et Forêts des Tropiques* 242:45-57
- Jamal A, Ayud N, Usman M, Khan AG (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soyabean and lentil. *International Journal of Phytoremediation* 4:205-221
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37:1-16
- Jin H, Pfeiffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2005) The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168:687-696
- Joffin JN, Leyral G (2001) Microbiologie technique 1, dictionnaire des techniques. 3e édition, Biologie technique 58 p
- Johansen A, Finlay RD, Olsson PA (1996) Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 133:705-712
- Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1993) Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biology and Fertility of Soils* 16:66-70
- Johnson MS, Bradshaw AD (1979) Ecological principles for the restoration of disturbed and degraded land. *Applied Biology* 4:141-200
- Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163:459-480
- Jordan WR (1988) Restoration ecology : a synthetic approach to ecological research. In: Cairns J (ed) *Rehabilitating damaged ecosystems*. CRC Press, Inc Boca Raton, Florida pp 13-21
- Jordan WR, Packard S (1989) Just a few oddball species: restoration practice and ecological theory. In: Buckley GP (ed) *Biological habitat reconstruction*. Belhaven Press, London pp 18-26
- Jost C (1998) Perception sociale et dimensions culturelles d'un nouveau projet minier en Nouvelle Calédonie. Dans : *Le voyage inachevé... à Joël Bonnemaïson*, ORSTOM, Paris pp 486-492
- Kalbitz K, Solinger S, Park JH, Michalzik B, Matzner E (2000) Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Science* 165:277-304

- Kazakou E, Dimitrakopoulos PG, Baker AJM, Reeves RD, Troumbis AY (2008) Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews* 83:495-508
- Keel C, Défago G (1997) Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: Gang AC, Brown VK (eds) *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Blackwell Scientific Publishers pp 27-46
- Kennedy AC (1999) Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74:65-76
- Kent M, Coker P (1992) *Vegetation description and analysis: a practical approach*. CRC Press, London 363 p
- Kentula ME (2000) Perspectives on setting success criteria for wetland restoration. *Ecological Engineering* 15:199-209
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2007) Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 27:29-43
- Killham K (1994) *Soil Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge 242 p
- Kim KY, Jordan D, McDonald GA (1998) *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry* 30:995-1003
- Kirk GJD, Santos EE, Findenegg GR (1999) Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. *Plant and Soil* 211:11-18
- Kloepper JW, Beauchamp CJ (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 38:1219-1232
- Kloepper JW, Schroth MN (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Dans : *Station de pathologie végétale et phyto-bactériologie* (ed) *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol II*. Tours: Gilbert-Clary pp 879-82
- Koide RT, Dickie IA (2002) Effects of mycorrhizal fungi on plant populations. *Plant and Soil* 244:307-317
- Koske RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA Mycorrhizas. *Mycological Research* 92:486-505
- Kumar V, Narula N (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum*. *Biology and Fertility of Soils* 28:301-305
- Lagadec G (2004) La stratégie des firmes multinationales face aux États : le cas de l'exploitation du nickel calédonien. *Mondes en Développement* 32:1-125
- Lagrange A, Ducouso M, Jourand P, Majorel C, Amir H (2009a) New insights into the mycorrhizal behaviour of Cyperaceae. Role of arbuscular mycorrhizas in growth and adaptation of *Costularia comosa* in New Caledonian ultramafic soils. *Soumis*
- Lagrange A, Rigault F, L'Huillier L, Derroire G, Ambrosi JP (2009b) Phytosociology and soil relationships on an ultramafic sequence of South-west New Caledonia. *Soumis*
- Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil* 321:33 p
- Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE (2008) Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology and Evolution* 23:95-103
- Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* 98:693-713
- Lamont B (1974) The biology of dauciform roots in the sedge *Cyathochaete avanaceae*. *New Phytologist* 73:985-996
- Lamont B (1993) Why are hairy root clusters so abundant in the most nutrient-impovertished soils of Australia? *Plant and Soil* 156:269-272

- Lamont B (1982) Mechanisms for enhancing nutrient uptake in plants, with particular reference to Mediterranean South Africa and Western Australia. *Botanical Review* 48:597-689
- Lamont B (2003) Structure, ecology and physiology of root clusters - a review. *Plant and Soil* 248:1-19
- Latham M (1985) Altération et pédogenèse sur roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie. *Études et Thèses ORSTOM*, Paris 331 p
- Latham M, Quantin P, Aubert G (1978) Etude des sols de la Nouvelle-Calédonie. Notice explicative 78 ORSTOM, Paris 138 p
- Lebuhn M, Heulin T, Hartmann A (1997) Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* 22:325-334
- Lee J, Brooks RR, Reeves RD, Boswell CR, Jaffré T (1977) Plant-soil relationships in a New Caledonian serpentine flora. *Plant and Soil* 46:675-680
- Leinhos V, Vacek O (1994) Biosynthesis of auxin by phosphate solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum* L.) and rye (*Secale cereale*). *Microbiological Research* 149:31-35
- Lemaire F, Papin JL (1985) Comparaison des besoins en éléments minéraux de différentes espèces de graminées à gazon. *Agronomie* 5:39-46
- Leyval C, Turnau K, Haselwander K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7:139-153
- L'Huillier L, Dupont S, Bonzon B, Dubus I, Becquer T, Bourdon E, Laubreaux P, Bonzon B (1998) Carence et fixation du phosphore dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie. XVIe Congrès Mondial de Science du Sol, 20–26 août Montpellier, France 8 p
- L'Huillier L, Edighoffer S (1996) Extractability of nickel and its concentration in cultivated plants in Ni rich ultramafic soils of New Caledonia. *Plant and Soil* 186:255-264
- Li L, Yang A, Zhao Z (2005) Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in grassland site in Southwest China. *Microbial Ecology* 54:367-373
- Li MS (2006) Ecological restoration of mineland with particular reference to the metalliferous mine wasteland in China: a review of research and practice. *Science of the Total Environment* 357:38-53
- Liesegang H, Lemke K, Siddiqui RA, Schlegel HG (1993) Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Journal of Bacteriology* 175:767-778
- Lindsay WL, Norvell WA (1978) Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42:421-428
- Liu ZL, Sinclair JB (1993) Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B153-2-2. *Soil Biology and Biochemistry* 25:849-855
- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M, Lelie DV (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21:586-606
- Lombini A, Dinelli E, Ferrari C, Simoni A (1998) Plant soil relationships in the serpentinite screes of Mt. Prinzera (Northern Apennines, Italy). *Journal of Geochemical Exploration* 64:19-33
- Lovera M, Cuenca G (1996) Arbuscular mycorrhizal colonisation in Cyperaceae and Gramineae from natural, disturbed and restored savannas in La Gran Sabana, Venezuela. *Mycorrhiza* 6:111-118
- Lubchenco J, Real LA (1991) Experimental manipulations in lab and field systems, manipulative experiments as tests of ecological theory. In: Real LA, Brown JH (eds), *Foundations of ecology*. The University of Chicago Press, Chicago pp 715-733
- Luçon S, Marion F, Niel JF, Pelletier B (1997) Rehabilitation des sites miniers sur roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie. Dans : Jaffré T, Reeves RD and Becquer T (eds) *Écologie des milieux sur roches*

- ultramafiques et sur sols métallifères, ORSTOM, Noumea pp 297-303
- Luken JO (1990) Directing Ecological Succession. Chapman and Hall, New York 251 p
- Malagoli P (2004) Modélisation de l'absorption de l'azote nitrique, de son allocation et de sa remobilisation chez le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) de la reprise de végétation au stade maturité des graines. Thèse, UMR INRA EVA Ecophysiologie végétale, INAPG 2004INAP0014
- Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A (2005) Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. *Annals of Botany* 95:853-861
- Malik KA, Bilal R, Rasul G, Mahmood K, Sajjad MI (1991) Associative N<sub>2</sub>-fixation in plants growing in saline sodic soils and its relative quantification based on <sup>15</sup>N natural abundance. *Plant and Soil* 137:67-74
- Manceau A, Calas G (1986) Nickel-bearing clay minerals; II, Intracrystalline distribution of nickel; an X-ray absorption study. *Clay Minerals* 21:341-360
- Manceau A, Llorca S, Calas G (1987) Crystal chemistry of cobalt and nickel in lithiophorite and asbolane from New Caledonia. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51:105-113
- Marschner H (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London 889 p
- Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159:89-102
- Marschner P, Rengel Z (2007) Nutrient cycling in terrestrial ecosystems. Springer-Verlag, Berlin 397 p
- Masclaux C, Quillere I, Gallais A, Hirel B (2001) The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physioagronomic and molecular approaches. *Annals of Applied Biology* 138:69-81
- Matsumoto LS, Martines AM, Avanzi MA, Albino UB, Brasil CB, Saridakis DP, Rampazo LGL, Zangaro W, Andrade G (2005) Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Applied Soil Ecology* 28:57-65
- McCoy S, Jaffré T, Rigault F, Ash JE (1999) Fire and succession in the ultramafic maquis of New Caledonia. *Journal of Biogeography* 26:579-594
- Meney KA, Dixon KW, Scheltema M, Pate JS (1993) Occurrence of vesicular mycorrhizal fungi in dryland species of Restionaceae and Cyperaceae from south-west Western Australia. *Australian Journal of Botany* 41:733-737
- Mengel K, Kirkby EA, Kosegarten H, Appel T (2001) Principles of Plant Nutrition. 5th Edition Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 864 p
- Mengoni A, Barzanti R, Gonnelli C, Gabbriellini R, Bazzicalupo M (2001) Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environmental Microbiology* 3:691-708
- Mengoni A, Grassi E, Barzanti R, Biondi EG, Gonnelli C, Kim CK, Bazzicalupo M (2004) Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology* 48:209-217
- Mercky S (1998) Rhizobactéries natives de Nouvelle-Calédonie, promotrices de croissance des plantes. Thèse, Université Française du Pacifique, centre Universitaire de Nouvelle-calédonie 145 p
- Mercky S (1999) Rhizobactéries natives de Nouvelle-Calédonie promotrices de la croissance des plantes. *Bois et Forêts des Tropiques* 262:80-83
- Mergeay M (1995) Heavy metal resistance in microbial ecosystems. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands pp 1-17
- Mergeay M, Monchy S, Vallaey T, Auquier V, Benotmane A, Bertin P, Taghavi S, Dunn J, van der Lelie D, Wattiez R (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews* 27:385-410
- Mergeay M, Nies D, Schlegel HD, Gerits J, Charles P, van Gijsegem F (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology* 162:328-334

- Miller MH, McGonigle TP, Addy HD (1995) Functional ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizas as influenced by phosphate fertilization and tillage in an agricultural ecosystem. *Critical Reviews in Biotechnology* 15:241-255
- Miller RM (2005) The nonmycorrhizal root – a strategy for survival in nutrient-impooverished soils. *New Phytologist* 165:655-658
- Miller RM, Smith CI, Jastrow JD, Bever JD (1999) Mycorrhizal status of the genus *Carex* (Cyperaceae). *American Journal of Botany* 86:547-553
- Mirete S, Figueras C, González-Pastor JE (2007) Novel Nickel Resistance Genes from the Rhizosphere Metagenome of Plants Adapted to Acid Mine Drainage. *Applied Environmental Microbiology* 19:6001-6011
- Morat P, Veillon JM, MacKee HS (1986) Affinités floristiques et considérations sur l'origine des maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie. *Adansonia* 2:133-182
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-950
- Muthukumar T, Udaiyan K (2002) Seasonality of vesicular-arbuscular mycorrhizae in sedges in a semi-arid tropical grassland. *Acta Oecologica* 23:337-347
- Muthukumar T, Udaiyan K, Manian S (1996) Vesicular-arbuscular mycorrhizae in tropical sedges of southern India. *Biology and Fertility of Soils* 22:96-100
- Muthukumar T, Udaiyan K, Shanmughavel P (2004) Mycorrhiza in sedges, an overview. *Mycorrhiza* 14:65-77
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858
- Nadarajah P, Nawawi A (1988) VAM fungi associated with *Theobroma cacao* in Malaysia. In: Mahadevan A, Raman N, Natarajan K (eds) *Mycorrhizae for green Asia*. Proceedings of the first Asian conference on mycorrhiza, University of Madras, Madras, India pp 4-6
- Nagy L, Proctor J (1997) Soil Mg and Ni as causal factors of plant occurrence and distribution at the Meikle Kilrannoch ultramafic site in Scotland. *New Phytologist* 135:561-566
- National Research Council (1992) Restoration of aquatic ecosystems. Science, technology and public policy. Committee on restoration of aquatic ecosystems, Water Science and Technology Board, Natl. Academy Press Washington DC 552 p
- Navarro E, Nalin R, Gauthier D, Normand P (1997) The nodular microsymbionts of *Gymnostoma* spp. are *Elaeagnus*-infective *Frankia* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1610-1616
- Neilands JB (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry* 270:26723-26726
- Neumann G, Martinoia E (2002) Cluster roots: an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science* 7:162-167
- Neumann G, Massonneau A, Langlade N, Dinkelaker B, Hengeler C, Römhelt V, Martinoia E (2000) Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Annals of Botany* 85:909-919
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:730-750
- Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27:313-339
- Noesmoen A, Millon R (1971) Carte géologique de la Nouvelle-Calédonie au 1/50.000e feuille Mont-Dore. BRGM et Territoire de la Nouvelle-Calédonie. Notice 18 p
- Nooden LD, Guamet JJ, John I (1997) Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* 101:746-753
- Osorio-Vega NW (2007) A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Review of the Faculty of Agronomy Medellin* 60:3621-3643

- Pal A, Choudhuri P, Dutta S, Mukherjee PK, Paul AK (2004) Isolation and characterization of nickel-resistant microflora from serpentine soils of Andaman. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:881-886
- Pal A, Wauters H, Paul AK (2007) Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant and Soil* 293:1-2
- Pan B, Vessey JK, Smith DL (2002) Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* or *Serratia liquefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein. *European Journal of Agronomy* 17:143-153
- Panaccione DG, Johnson RD, Wang JH, Young CA, Damrongkool P, Scott B, Schardl CL (2001) Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:12820-12825
- Park MK, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T (2005) Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* 160:127-133
- Pearson JN, Jakobsen I (1993) The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labelling with <sup>32</sup>P and <sup>33</sup>P. *New Phytologist* 124:489-494
- Pelletier B (2003) Les methodes d'exploitation et de revegetalisation mises en place deuis les années 70 sur les mines de nickel de Nouvelle-Caledonie. *Bulletin de l'Union Française des Géologues, Département Géologie-Sondages, Société Le Nickel, Nouméa* 7 p
- Perrier N (2005) Bio-géodiversité fonctionnelle des sols latéritiques miniers : application à la restauration écologique (Massif du Koniambo, Nouvelle-Calédonie). Thèse de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa 213 p
- Perrier N, Ambrosi JP, Collin F, Gilkes RJ (2006b) Biogeochemistry of a regolith: The New Caledonian Koniambo ultramafic massif. *Journal of Geochemical Exploration* 88:54-58
- Perrier N, Amir H, Collin F (2006a) Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16:446-458
- Picard M (1999) L'archipel néo-calédonien : 300 millions d'années pour assembler les pièces d'un puzzle géologique. Centre de documentation pédagogique de Nouvelle-Calédonie, Impression Graphoprint 102 p
- Playsted CWS, Johnston ME, Ramage CM, Edwards DG, Cawthray GR, Lambers H (2006) Functional significance of dauciform roots: exudation of carboxylates and acid phosphatase under phosphorus deficiency in *Caustis blakei* (Cyperaceae). *New Phytologist* 170:491-500
- Postgate JR (1972) The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In: Norris JR, Ribbons DW (eds) *Methods in microbial*. Academic Press, London 6B:343-356
- Potée N (2008) Bilan des semis hydrauliques effectués par Siras Pacifique de 2003 à 2007 sur la mine de Thiebaghi. Rapport de fin d'étude, Siras Pacifique/INP-ENSAT 44 p
- Powell CL (1975) Rushes and sedges are non-mycotrophic. *Plant and Soil* 42:481-484
- Proctor J (2003) Vegetation and soil and plant chemistry on ultramafic rocks in the tropical Far East. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 6:105-124
- Proctor J, Nagy L (1992) Ultramafic rocks and their vegetation: an overview. In: Baker AJM, Proctor J, Reeves RD (eds) *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*. Intercept, Andover, Oregon pp 470-495
- Quantin C, Becquer T, Berthelin J (2002) Mn-oxide: A major source of easily mobilisable Co and Ni under reducing conditions in New Caledonia Ferralsols. *Comptes Rendus Geoscience* 334:273-278
- Quantin C, Becquer T, Rouiller JH, Berthelin J (2001) Oxide weathering and trace metal release by bacterial reduction in a New Caledonia Ferralsol. *Biogeochemistry* 53:323-340
- Quantin P, Bourdon B, Becquer T (1997) Minéralogie et contraintes édaphiques des sols ferritiques dérivés de roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie: relations entre constituants minéraux et disponibilité en certains éléments (Al, Fe, Si, Mg, Mn, Ni, Co, Cr, Cu, Zn et Mo) facilement solubles. In: Jaffré T, Reeves RD and

- Becquer T (eds) Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères. ORSTOM, Noumea pp 13-25
- Rajakaruna N (2004) The edaphic factor in the origin of plant species. *International Geology Review* 46:471-478
- Ranjard L, Richaume AS (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* 152:707-716
- Raynal J (1974) Les *Costularia* de Nouvelle Calédonie. *Notes cypérolologiques* 22:1-40
- Read J, Jaffre T, Ferris JM, McCoy S, Hope GS (2006) Does soil determine the boundaries of monodominant rain forest with adjacent mixed rain forest and maquis on ultramafic soils in New Caledonia? *Journal of Biogeography* 33:1055-1065
- Reis VM, Baldani JI, Baldani VLD, Döbereiner J (2000) Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19:227-247
- Reynolds HL, Hartley AE, Vogelsang KM, Bever JD, Schultz PA (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi do not enhance nitrogen acquisition and growth of old-field perennials under low nitrogen supply in glasshouse culture. *New Phytologist* 167:869-880
- Reznicek AA (1990) Evolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Canadian Journal of Botany* 68:1409-1432
- Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:897-906
- Richardson AE, Barea J-M, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305-339
- Rick WY, Stuart MT (2001) Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology* 4:307-312
- Rigault F, Dagostini G, Jaffré T (1997) Relations entre les teneurs en nickel et manganèse foliaires de quelques espèces des maquis miniers et les risques de phyto-toxicité induits par ces éléments minéraux du sol. Dans : Jaffré T, Reeves RD, Becquer T (eds) Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères, ORSTOM, Noumea pp 187-195
- Robinson BH, Brooks RR, Kirkman JH, Gregg PEH, Alvarez HV (1997) Edaphic influences on a New Zealand ultramafic ("serpentine") flora: A statistical approach. *Plant and Soil* 18:11-20
- Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319-339
- Rodriguez H, Vessely S (2008) Effect of a Nickel-Tolerant ACC Deaminase-Producing *Pseudomonas* Strain on Growth of Nontransformed and Transgenic Canola Plants. *Current Microbiology* 57:170-174
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:827-837
- Rossolini GM, Schippa S, Ricco ML, Berlutti F, Macaskie LE, Thaller MC (1998) Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54:833-850
- Ruotsalainen AL, Väre H, Vestberg M (2002) Seasonality of root fungal colonization in low-alpine herbs. *Mycorrhiza* 12:29-36
- Saintpierre D, Amir H, Pineau R, Sembiring L, Goodfellow M (2003) *Streptomyces yatensis* sp. nov., a novel bioactive streptomycete isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 83:21-26
- Saintpierre-Bonaccio D, Amir H, Pineau R, Tan GYA, Goodfellow M (2005) *Amycolatopsis plumensis* sp. nov., a novel bioactive actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic International soil. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:2057-2061

- Saintpierre-Bonaccio D, Maldonado LA, Amir H, Pineau R, Goodfellow M (2004) *Nocardia neocaledoniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a New Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:599-603
- de Salamone IEG, Hynes RK, Nelson LM (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47:404–411
- Sarrailh JM (2002) La revégétalisation des exploitations minières : l'exemple de la Nouvelle-Calédonie. *Bois et forêts des tropiques* 272:21-31
- Sarrailh JM, Ayrault N (2001) Revégétalisation des sites des anciennes mines de nickel en Nouvelle-Calédonie. (FAO) *Unasylva* 52:16-20
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* 116:447-453
- Schlegel HG, Cosson JP, Baker AJM (1991) Nickel-hyperaccumulating plants provide a niche for nickel-resistant bacteria. *Botanica Acta* 194:18-25
- Schmidt T, Schlegel HG (1994) Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *Journal of Bacteriology* 176:7045-7054
- Schüssler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421
- Schüzendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53:1351-1365
- Selosse MA, Baudoin E, Vandenkoornhuyse P (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327:639-648
- SER (Society for Ecological Restoration, Science and Policy Working Group) (2002) The SER Primer of Ecological Restoration. [www.ser.org/Primer](http://www.ser.org/Primer)
- Shane MW, Cawthray GR, Cramer MD, Kuo J, Lambers H (2006) Specialized "dauciform" roots of Cyperaceae are structurally distinct, but functionally analogous with "cluster" roots. *Plant, Cell and Environment* 29:1989-1999
- Shane MW, Cramer MD, Lambers H (2008) Root of edaphically controlled Proteaceae turnover on the Agulhas Plain, South Africa: phosphate uptake regulation and growth. *Plant, Cell and Environment* 31:1825-1833
- Shane MW, Dixon KW, Lambers H (2005) The occurrence of dauciform roots amongst Western Australia reeds, rushes and sedges, and the impact of P supply on dauciform-root development in *Shoenus unipiculatus* (Cyperaceae). *New Phytologist* 165:887-898
- Silver S (1998) Genes for all metals - a bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom Award Lecture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20:1-12
- Silver S, Phung LT (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology* 50:753-789
- Silver S, Phung LT (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32:587-605
- Simon LM, Lalonde TD, Bruns TD (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular arbuscular endomycorrhizal fungi colonising roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58:291-295
- Singh B, Sherman DM, Gilkes RJ, Wells MA, Mosselmans JFW (2002) Incorporation of Cr, Mn and Ni into goethite ( $\alpha$ -FeOOH): mechanism from extended X-Ray absorption fine structure spectroscopy. *Clays and clay minerals* 37:639-649
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego 605 p
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd edition Academic Press, San Diego 787 p



- Solaiman MZ, Saito M (2001) Phosphate efflux from intraradical hyphae of *Gigaspora margarita* *in vitro* and its implication for phosphorus translocation. *New Phytologist* 151:525-533
- Sood SG (2003) Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular–arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiology Ecology* 45:219-227
- Stengel P, Gelin S (1998) Sol: interface fragile. INRA (ed) 133 p
- Stoppel RD, Schlegel HG (1995) Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems *Applied and Environmental Microbiology* 61:2276-2285
- Tester M, Smith SE, Smith FA (1987) The phenomenon of “non-mycorrhizal” plants. *Canadian Journal of Botany* 65:419-431
- van Tichelen KK, Colpaert JV, Vangronsveld J (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist* 150:203-213
- Tilman D (1994) Competition and biodiversity in spatially structured habitats. *Ecology* 75:2-16
- Tisdale SL, Nelson WL, Beaton JD (1985) Soil Fertility and Fertilizers. MacMilan Publisher, New York 754 p
- Toler HD, Morton JB, Cumming JR (2005) Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. *Water Air and Soil Pollution* 164:155-172
- Toussaint JP, St-Arnaud M, Charest C (2004) Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck and Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an *in vitro* compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology* 50:251-260
- Trescases JJ (1975) L'évolution géochimique supergène des roches ultrabasiques en zone tropicale. Mémoire ORSTOM Paris 78 p
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. INRA, Paris pp 217-221
- Turnau K, Mesjasz-Przybyłowicz J (2003) Arbuscular mycorrhizal of *Berkheya codii* and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* 13:185-190
- Turnau K, Orlowska E, Ryszka P, Zubek S, Anielska T, Gawronski S, Jurkiewicz A (2006) Role of mycorrhizal fungi in phytoremediation and toxicity monitoring of heavy metal rich industrial wastes in Southern Poland. In: Twardowska I, Allen HE, Häggblom MM (eds) Soil and water pollution monitoring, protection and remediation. Springer, Dordrecht pp 533-551
- Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2001) Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in Southern Poland. *Mycorrhiza* 10:169-174
- Vandamme P, Giovan J, Lipuma JJ (2007) Diversity and role of *Burkholderia* spp. In: Vandamme P, Coenye T (eds) *Burkholderia: Molecular Biology and Genomics*. Horizon Scientific Press, Norwich, UK pp 1-27
- Vedele FD, Filleur S, Caboche M (1998) Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current Opinion in Plant Biology* 1:235-239
- Vessey J K (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586
- Vincent (1970) A Manual for the Practical Study of the Root-nodule Bacteria. Blackwell Scientific, IBP Handbook 15, Oxford 164 p
- Wang B, Qiu YL (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299-363
- Wulff A, L'Huillier L, Veà C, Tassin J (2008) Caractéristiques germinatives de graines d'espèces indigènes candidates à la restauration des sites ultramafiques dégradés de Nouvelle-Calédonie. Edition IAC, Rapport de convention SYSMIN 8e FED 92 p
- Zedler JB, Weller MW (1990) Overview and future directions. In: Kusler J, Kentula ME (eds) Wetland creation and restoration: the status of the science. Island Press, Washington DC pp 405-413

Zhou D, Zhang L, Guo SL (2005) Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads. *Water Research* 39:3755-3762



# Listes des figures et des tableaux

## Liste des figures

### Introduction et synthèse bibliographique

**Figure 1.** (A) Situation de la Nouvelle-Calédonie dans le Sud Est Pacifique. (B) Localisation des affleurements ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (en gris)

**Figure 2.** Coupes schématiques illustrant les étapes de formation de la Nouvelle-Calédonie, notamment les phénomènes de subduction et d'obduction

**Figure 3.** Profil typique de l'altération latéritique sur péridotite

**Figure 4.** Morphologies de racines "cluster" induit par de faible teneur en phosphate. À gauche, racine protéoïdes de *Banksia* sp. d'Australie (échelle 13 mm), à droite racine dauciforme de *Tetraria* sp. d'Afrique du Sud (échelle 4mm) (d'après Lambers et al. 2006)

**Figure 5.** Effet des carboxylates la mobilisation de phosphore inorganique et organique dans les sols. Les carboxylates sont relâchés par des canaux ioniques. Les phosphatases hydrolysent les P organiques qui sont mibilisés par les carboxylates (d'après Lambers et al. 2006)

**Figure 6.** Schéma représentant deux coupes transversales de racine montrant les types principaux de colonisation des racines par les champignons mycorhiziens

**Figure 7.** Schéma représentant la classification simplifiée des Gloméromycètes

**Figure 8.** Modèle du transport de l'azote et de son métabolisme dans le système symbiotique entre la racine et l'AMF. N inorganique est absorbé par le mycélium extraracinaire (ERM), puis transloqué le long de l'hyphe jusqu'au mycellium intraracinaire (IRM) sous forme de N incorporé à l'arginine.  $\text{NH}_4$  relâché par l'arginine passe à la plante (host) par les transporteurs d'ammonium (Pi : orthophosphate ; PolyP : polyphosphate) (D'après Jin et al. 2005)

**Figure 9.** Relations phylogénétiques entre différents genres de bactéries de l'embranchement des Proteobactéries incluant les alpha, bêta, delta, gamma et epsilon qui représente les différentes subdivisions des Proteobactéries. Les principaux genres de bactéries isolées dans les rhizosphères appartiennent aux groupes des alpha et bêta Proteobactéries, représentés sur cet arbre phylogénétique (d'après Moulin et al. 2001)

### Chapitre 1

**Figure 1.1.** (A) Situation of the New Caledonia in the South East Pacific (B) Map of the ultramafic bodies of New Caledonia (in grey) with the study site location (C) Toposequence localised on the catchment area

**Figure 1.2.** Relief map of the topographic sequence situated on a south slope of small catchment downstream part of Lucky River with plot locations and numbering

**Figure 1.3.** Dendrogram of the agglomerative hierarchical clustering performed on the phytosociology data of the sequence shows 4 phytosociological groups (PG1 to PG4) with a similarity index of 36%

**Figure 1.4.** Two dimensional non-metric multidimensional scaling (NMDS) of the 95 floristic plots along the soil sequence

**Figure 1.5.** Principal component analysis and correlation biplot after varimax rotation between 18 chemical variables and 95 samples

**Figure 1.6.** Dendrogram of the agglomerative hierarchical clustering performed on the results of the soils sequence aqueous extractions and CEC (n=91).

**Figure 1.7.** Dendrogram of the agglomerative hierarchical clustering performed on the results of the soils sequence KCl extractions (n=80)

**Figure 1.8.** Dendrogram of the agglomerative hierarchical clustering performed on the results of the soils DTPA extractions (n= 91)

**Figure 1.9.** Hierarchisation obtained for the 89 plots of the sequence in accordance with phytosociology grouping (PG1 to PG4), bulk chemistry (CG1 to CG3), aqueous extract and CEC (A1 or A2), KCl extractions (K1 to K5) and DTPA extractions (D1 to D4)

## Chapitre 2

**Figure 2.1.** (A) Carte des roches ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (en gris) avec la localisation du site d'étude. (B) Carte des reliefs du bassin versant étudié dans le massif ultramafique du Sud, avec la localisation de l'essai sur le bassin versant. (C) Situation topographique du champ semencier sur le site d'étude

**Figure 2.2.** Précipitations moyennes mensuelles mesurées à la station Météo-France de Plum entre mars 2006 et février 2008 (Météo-France, Nouméa)

**Figure 2.3.** Description du profil pédologique type avant la mise en place du champ semencier. Les sols de la parcelle issue de roches péridotitiques sont définis par les pédologues comme des sols ferrallitiques ferritiques colluviaux

**Figure 2.4.** Schéma de la parcelle expérimentale avec la répartition aléatoire des placettes et des plants suivis de l'essai de fertilisation

**Figure 2.5.** Photographie d'une placette de l'essai en blocs aléatoires complets

**Figure 2.6.** Courbes de croissance des hauteurs moyennes (cm) de *Costularia comosa* pendant les 16 mois de suivi (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)

**Figure 2.7.** Courbes d'évolution du nombre de talles de *Costularia comosa* pendant les 16 mois de suivi (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)

**Figure 2.8.** Courbes d'évolution du nombre de talles et de hampes florales de *Costularia comosa* pendant les 16 mois de suivi (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)

**Figure 2.9.** Effet de la dose de la fertilisation sur le nombre moyen de talles par pied de *Costularia comosa* après deux ans de croissance en plein champ

**Figure 2.10.** Effet de la fertilisation sur la période et l'intensité de la floraison (total des fleurs en boutons et des fleurs ouvertes) chez *Costularia comosa*. (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)

**Figure 2.11.** Effet de la fertilisation sur le nombre d'individus portant des fruits matures chez *Costularia comosa*. (Moyennes effectuées sur 30 individus par groupe de traitement)

**Figure 2.12.** Schéma du cycle de croissance et de fructification de l'espèce *Costularia comosa* cultivée en plein champ

**Figure 2.13.** Effet de la fertilisation sur le nombre moyen de hampes florales par pied de *Costularia comosa* cultivé en plein champ (Mesures réalisées en **décembre 2007**, 20 mois après plantation).

**Figure 2.14.** Effet de la fertilisation sur le nombre moyen de hampes florales par pied de *Costularia comosa* cultivé en plein champ. (Mesures réalisées en **décembre 2008**, 32 mois après plantation)

**Figure 2.15.** Nombre moyen de graines pour 18 pieds de *Costularia Comosa* selon le traitement de fertilisation (Mesures réalisées sur 90 individus en décembre 2007)

**Figure 2.16.** Nombre moyen de graines par hampes de *Costularia Comosa* selon le traitement de fertilisation (Mesures réalisées sur les récoltes de décembre 2007)

**Figure 2.17.** Régression linéaire entre le nombre de graines par placette et le nombre de hampes par placette (n=45)

**Figure 2.18.** Courbes d'évolution des taux de germination des graines (%) de *Costularia comosa* produites dans 9 conditions de fertilisations différentes (22°/29°C, cycle d'éclairage 12H par 24H)

**Figure 2.19.** Effet de la fertilisation sur les taux de germination après 45 jours des graines de *Costularia comosa* produites dans les 9 conditions de fertilisations différentes

**Figure 2.20.** Quantités moyennes d'azote (en mg/kg) dans les différentes parties d'une plante de *C. comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

**Figure 2.21.** Quantités moyennes de phosphore (en mg/kg de matière sèche) dans les différentes parties d'une plante de *C. comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

**Figure 2.22.** Evolution des teneurs en azote total des sols non-rhizosphériques au cours du temps en fonction des doses d'azote apportées par la fertilisation

**Figure 2.23.** Évolution de la quantité de phosphore total des sols non-rhizosphériques au cours du temps

**Figure 2.24.** Teneurs en nitrate (NO<sub>3</sub>) des sols non-rhizosphériques à T<sub>2</sub> (août 2007) et T<sub>3</sub> (février 2008)

**Figure 2.25.** Teneurs en NH<sub>4</sub> des sols non-rhizosphériques à T<sub>2</sub> (août 2007) et T<sub>3</sub> (février 2008)

**Figure 2.26.** Évolution de la quantité de phosphore assimilable des sols non-rhizosphériques au cours du temps

**Figure 2.27.** Teneurs en azote total dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à T<sub>3</sub> en fonction des doses d'azote apportées

**Figure 2.28.** Teneurs en nitrates dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à T<sub>3</sub> en fonction des doses d'azote apportées

**Figure 2.29.** Teneurs en ammonium dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à T<sub>3</sub> en fonction des doses d'N apportées

**Figure 2.30.** Quantité de phosphore total dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à T<sub>3</sub> en fonction des doses de phosphore apportées

**Figure 2.31.** Quantité de phosphore assimilable dans les sols rhizosphériques et non-rhizosphériques à T<sub>3</sub> en fonction des doses de phosphore apportées

### Chapitre 3

**Figure 3.1.** Microscopic observation of arbuscular mycorrhizas in *Costularia comosa* after staining with Trypan blue (Koske and Gemma 1989) and mounting in 10 % glycerol. A: arbuscules observed in a plant inoculated by strain SFONL; B: *Glomus*-type Vesicles in the cortex of plant root; C: infection by arbuscular mycorrhizas in a dauciform root. D: Spore intraracinaire de *Glomus* sp. The bare represent 50 µm

### Chapitre 4

**Figure 4.1.** Localisation des affleurements ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (en gris) avec la position des sites 1 et 2 dans le Nord et des sites 3 et 4 dans le Sud

**Figure 4.2.** Structure des populations de rhizobactéries isolées au contact des racines de *C. arundinacea* et *C. nervosa*, fréquence des principaux genres identifiés



## Liste des tableaux

### Chapitre 1

**Table 1.1.** Elements ( $\text{cmol kg}^{-1}$ ), pH, electric conductivity (EC in  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) and CEC ( $\text{cmol kg}^{-1}$ ) mean values and mean standard deviations (*italic*) for the two clusters A1 and A2 obtained after agglomerative hierarchical clustering of the soils aqueous extraction and CEC results

**Table 1.2.** Elements ( $\text{mg/kg}$ ) mean values and mean standard deviations (*italic*) for the five clusters obtained after agglomerative hierarchical clustering of the soils KCl extraction results

**Table 1.3.** Elements ( $\text{mg/kg}$ ) mean values and mean standard deviations for the four clusters obtained after agglomerative hierarchical clustering of the soils DTPA extraction results

**Supplementary data 1.** Chemical analysis of the total element in soil used for Principal Component Analysis

**Supplementary data 2.** SIMPER (Similarity Percentage) analysis – species contribution up 95% to the average Bray Curtis similarity in phytosociological groups 1, 2, 3, 4

### Chapitre 2

**Tableau 2.1.** Effet de la dose de N et de P sur les poids secs moyens des parties racinaires, aériennes et fructifères par plant de *Costularia comosa* après deux ans de croissance en plein champ

**Tableau 2.2.** Concentrations en azote ( $\text{g/100g}$  de matière sèche) dans les différentes parties de *Costularia comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

**Tableau 2.3.** Concentrations en phosphore ( $\text{mg/kg}$  de matière sèche) dans les différentes parties de *C. comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

**Tableau 2.4.** Quantités d'azote ( $\text{mg/plante}$ , rapporté à la matière sèche) dans les différentes parties de *C. comosa*, en fonction des 9 traitements de fertilisation

**Tableau 2.5.** Quantités de phosphore ( $\text{mg/plante}$ , rapporté à la matière sèche) par plante dans les différentes parties de *C. comosa* en fonction des 9 traitements de fertilisation

**Tableau 2.6.** Quantités de nickel ( $\text{mg/plante}$ , rapporté à la matière sèche) par plante dans les différentes parties de *C. comosa*, en fonction des 9 traitements de fertilisation

**Tableau 2.7.** Comparaison des concentrations (en % ou en  $\text{mg/kg}$  de matière sèche), en éléments analysés dans les différentes parties des plants de *C. comosa*, entre ceux cultivés en plein champ (N0P0) et ceux prélevés en milieu naturel

**Tableau 2.8.** Effets de la dose d'azote et de phosphore sur les intensités globales, arbusculaires et vésiculaires de mycorhization des plants de *Costularia comosa*

**Tableau 2.9.** Matrice de corrélation (coefficient de Pearson) entre les paramètres de mycorhization et les poids de matières sèches des plants fertilisés avec le traitement N2P2

**Tableau 2.10.** Matrice de corrélation (coefficient de Pearson) entre les paramètres de mycorhization et les taux de P dans les sols pour les quatre traitements de fertilisation étudiés

**Tableau 2.11.** Matrice de corrélation (coefficient de Pearson) entre les paramètres de mycorhization et les concentrations en éléments N, P, K, Ni dans la plante pour les quatre traitements de fertilisation étudiés

### Chapitre 3

**Table 3.1.** Frequency (F%)\* and intensity (M%)\* of arbuscular mycorrhizal colonisation within 9 sedge species collected in the field from 4 different ligno-herbaceous maquis ( $\pm\text{SD}$ : standard deviation)

**Table 3.2.** Dry weight (g) and N, P, K and Ni contents ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) of shoots and roots of *Costularia comosa* inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungi (natural inoculum or strain SFONL)



**Table 3.3.** Analyses of linear total correlations between mycorrhizal frequency (F%), mycorrhizal intensity (M%) and growth parameters of *Costularia comosa* inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungi (Natural inoculum or strain SFONL)

## **Chapitre 4**

**Tableau 4.1.** Caractéristiques chimiques des sols rhizosphériques de *Costularia* des quatre différents sites d'études

**Tableau 4.2.** Mesures des activités réductrices d'acétylène des échantillons de rhizosphère de *C. arundinaceae* et *C. nervosa* des sites 3 et 4, par chromatographie en phase gazeuse

**Tableau 4.3.** Densité totale et résistante à 1 mM de Ni des populations bactériennes au contact des racines de *C. arundinacea* et *C. nervosa*

**Tableau 4.4.** Caractérisation phénotypique des bactéries isolées à partir des racines des deux espèces de *Costularia*, caractérisation fonctionnelle de la tolérance au nickel et de la capacité à solubiliser les phosphates, des souches sélectionnées

**Tableau 4.5.** Résultats par Blast-N des analyses de séquences partielles de la petite SU 16S de l'ADNr de *Costularia arundinacea*

**Tableau 4.6.** Résultats par Blast-N des analyses de séquences partielles de la petite SU 16S de l'ADNr de *Costularia nervosa*

**Tableau 4.7.** Nombre de bactéries appartenant aux 15 genres bactériens identifiés au contact des racines des deux espèces de *Costularia* prélevées dans 4 sites de maquis





## ***Recommandations pour la restauration écologique des sites miniers***

### **Gestion des Top-soils**

Le top-soil contient les éléments nécessaires pour réamorcer une végétation biologiquement équilibrée : les microorganismes du sol, le stock de semences et les nutriments. Il faut bien sûr se donner les moyens d'une bonne gestion de ce top-soil pour optimiser une reprise efficace et rapide de la végétation. La fragilité et la rareté des top-soils de qualité pour la restauration nécessitent une grande attention quant à leur maniement. Le prélèvement trop important en épaisseur d'un sol de surface, qui serait ensuite retourné et mélangé est inefficace, les semences et les microorganismes se retrouvent enfouis et non viables. Pour éviter la dégradation des top-soils, leur stockage en tas devra être évité et leur application sur le site à restaurer devra être réalisée le plus rapidement après leur décapage. Ainsi pour une gestion efficace des top-soils, des équipes spécialisées devront être constituées (chefs de chantier, conducteurs d'engin, ouvriers formés et sensibilisés à la bonne gestion des sols) pour optimiser au mieux la réinstallation d'un sol de qualité afin de réamorcer l'établissement d'un écosystème. Les coûts apparemment excessifs pour la gestion des top-soils devront être mis en concurrence avec le gain de temps et les bénéfices écologiques obtenus en prenant ces précautions.

### **Itinéraires techniques généraux des étapes de la restauration écologique**

Les caractéristiques du sol à restaurer doivent être connues (analyses physico-chimiques et biologiques), afin de décider des méthodes d'amélioration. L'utilisation du top-soil minier frais par épandage sur les sites à restaurer apparaît le meilleur moyen de réintroduire un socle de matière organique et son cortège microbien associé. La solution unique de revégétalisation n'existe pas, cependant le schéma idéal de restauration des sites miniers serait de planter des espèces pionnières dans des top-soils frais où étaient implantées à l'origine ces mêmes espèces. Ces

dispositifs imposent la conception de projets de restauration dans lesquels un plan de gestion sera mis en place avec des objectifs clairs en termes de réussite qui devront être validés. Après un diagnostic de l'état du site, différents plans de restauration peuvent être établis puis comparés en fonction de leur coût et de leur chance d'atteindre l'objectif. Le plan choisi, une fois détaillé, sert de guide aux travaux sur le terrain.

La planification précise des travaux est donc essentielle pour optimiser et accélérer la reprise de la végétation. Sur le terrain, les travaux de récolte des graines, de production des plants, de récupération des top-soils, de transplantation d'espèces d'intérêt soit en pépinière soit sur une zone à réhabiliter, d'épandage de ces sols et enfin de plantation des espèces produites en pépinière seront effectués par des équipes spécialisées. La plantation d'espèces pionnières, immédiatement après épandage du top-soil, permettrait de conserver au mieux les populations microbiennes présentes dans le sol. En effet, par l'intermédiaire de leurs racines, les plantes sont le meilleur matériel pour favoriser le rétablissement rapide de l'équilibre biologique au sein des sites à restaurer. Des enceintes de germination contrôlée pourront accélérer les phénomènes de germination souvent naturellement longs. Les pépinières occuperont des zones proches des sites à revégétaliser afin d'approvisionner les chantiers en plants endémiques à caractère pionnier déjà présents sur les massifs miniers en exploitation. L'établissement du couvert herbacé par les Cyperaceae devra s'accompagner de l'introduction d'espèces ligneuses pionnières (*Alphitonia neocaledonica*, *Gymnostoma* sp., *Peripterigia marginata*, *Hibbertia lucens*, *H. vieillardii*, *Styphelia pancheri*, *S. cymbulae*, *Longetia buxoides*, *Grevillea* sp., *Stenocarpus umbelliferus*). Les semences présentes dans les top-soils de qualité pourront être mises en valeur sur site en favorisant les conditions de germination par l'application d'ombrages et d'arroseurs installés temporairement le temps de la germination des graines et de l'installation des plants.

Chaque chantier devra donc être considéré comme un cas particulier. Par exemple, les sites des verses à stériles, pourraient être assimilés à des chantiers de végétalisation mobiles où ombrières et arrosages seraient appliqués au fur et à mesure des travaux pour améliorer le développement des jeunes plants, afin d'accélérer et d'assurer la reprise d'une végétation primaire abondante, qui n'est qu'une étape de réinitialisation des processus biologiques devant aboutir à la remise en fonctionnement de maquis plus diversifié. Ceci est réalisable sur les zones planes

à revégétaliser, les zones en pente doivent donc être limitées par les exploitants miniers afin de faciliter les processus de revégétalisation. Pour la technique d'hydroseeding souvent appliquée sur les pentes, l'idéal serait de recourir à des pratiques qui favorisent les conditions de germination des espèces endémiques : prégermination des semences, mise en place de larges toiles d'ombrages et d'un arrosage en brouillard le temps de la germination des semences de Cyperaceae (environ 1 mois). Ces techniques seront certes coûteuses et difficiles à mettre en œuvre dans les zones pentues mais prometteuses en termes de germination de graines des espèces endémiques.

Lors de ces travaux de restauration, une attention particulière sera portée à la prolifération des graminées introduites sur le territoire. Il sera indispensable lors des travaux de plantation et de confection de champs semenciers à partir d'espèces élevées en pépinière et plantées sur des terrains fertilisés, que les herbacées potentiellement invasives, souvent abondantes à la surface des mottes des plants produits, soient bien désherbées. Un suivi très strict de la propagation sur chantiers après plantation doit être effectué rapidement et régulièrement afin d'éviter les phénomènes de propagation de ces espèces à caractère envahissant. Le désherbage doit être soigneusement effectué avant la fructification et la dispersion de leurs graines.

Dans ce contexte, les dispositifs permettant d'aboutir à une évaluation du succès d'une opération de restauration ou de reconstruction écologique devraient être pris en compte dès la conception de tout projet. En effet, se fixer des normes de réussite, présence de telle ou telle espèce, retour de tel ou tel processus, permet de préciser sans ambiguïté ses objectifs en termes opérationnels et d'éviter les formulations trop vagues qui rendent toute évaluation des résultats impossibles. Intervient alors la phase de suivi à proprement parler, qui, pour être efficace, se révèle souvent complexe et laborieuse. Il est recommandé de s'entourer d'avis de scientifiques pour mener à bien un suivi et une évaluation : sélection d'indicateurs, calendrier de collecte des données, traitement et interprétation des résultats. En restauration écologique, la durée moyenne du suivi pour la plupart des projets est de 5 à 10 ans au moins. Si les critères de réussite sont atteints, les mesures doivent être poursuivies pendant 10 à 20 ans, afin d'évaluer la réinitialisation des processus biologiques secondaires à plus long terme aboutissant à une restauration de maquis équilibrés.

Ce schéma général s'applique à toute opération de restauration écologique. Cependant, dans la réalité, force est de constater que l'évaluation de la conformité des projets est souvent difficile, en raison d'un suivi inapproprié ou d'objectifs trop imprécis car considérés comme marginaux. Pourtant, si les acquis en recherche fondamentale et appliquée contribuent au développement de l'écologie de la restauration, les progrès viendront surtout d'une analyse approfondie des causes de la réussite ou de l'insuccès des opérations. En effet, le manque de suivi signifiera la persistance à ignorer les enseignements à tirer de ces expérimentations, ce qui induira la poursuite de mauvaises pratiques ou de pratiques non conformes avec les objectifs recherchés.